

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS
MEDIADORES Y MARCADORES DE
DAÑO RENAL IDENTIFICADOS
MEDIANTE TRANSCRIPTÓMICA**

**OLGA RUIZ ANDRÉS
Madrid, 2016**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS
MEDIADORES Y MARCADORES DE
DAÑO RENAL IDENTIFICADOS
MEDIANTE TRANSCRIPTÓMICA**

Memoria que presenta la licenciada en Biología

Olga Ruiz Andrés

para optar al grado de Doctor

por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de tesis:

Dr. Alberto Ortiz Arduan

Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz

Universidad Autónoma de Madrid

RESUMEN

El fracaso renal agudo (FRA) es una condición potencialmente letal para la cual no existe terapia más allá del reemplazo de la función renal, que puede evolucionar a enfermedad renal crónica. El estudio de sus mecanismos patogénicos puede permitir el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos. En este sentido, hipotetizamos que el estudio detallado de los mecanismos moleculares reclutados por TWEAK, una citoquina que contribuye al daño renal, puede ayudar a diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

Las modificaciones postraduccionales de histonas modulan la expresión génica y el daño renal. Dentro de estas, la crotonilación de histonas es una modificación postraduccionales de histonas descrita recientemente. El primer objetivo fue estudiar la regulación y el impacto de la crotonilación en la enfermedad renal. La crotonilación de histonas se estudió en células murinas de túbulo proximal en cultivo y en riñones de ratones con FRA inducido por ácido fólico o cisplatino y se observó que aumenta durante el FRA y en células tubulares en cultivo expuestas a la citoquina TWEAK. Además, experimentos de ChIP-seq desvelaron mayores niveles de crotonilación de histonas en los genes que codifican para el regulador de biogénesis mitocondrial PGC-1 α y la decrotonilasa sirtuina-3 (SIRT3) tanto en células tubulares estimuladas con TWEAK como en tejido renal murino de FRA. El siguiente paso fue evaluar el papel de la crotonilación en el daño renal. El crotonato aumentó la crotonilación de histonas *in vitro* e *in vivo*, y la expresión de PGC-1 α y SIRT3, y disminuye la de CCL2 en células tubulares en cultivo y en riñones sanos. Además, la administración sistémica de crotonato protege frente al FRA experimental. En esta tesis se ha identificado por primera vez factores, tales como el estrés celular y la disponibilidad de crotonato, que aumentan la crotonilación de histonas *in vivo* e *in vitro*; y este aumento podría tener un efecto beneficiosos en el FRA.

Por otro lado, el éxito de las pruebas de agentes nefroprotectores dirigidos a la mitocondria sugieren un papel clave del daño mitocondrial en el FRA. Un mejor conocimiento de la regulación de los factores responsables de la biogénesis mitocondrial podría darnos pistas para nuevas aproximaciones terapéuticas para el FRA. Por ello, como segundo objetivo de esta tesis se estudió la interacción entre la inflamación y los reguladores de biogénesis mitocondrial. Por transcriptómica se identificó una disminución de PGC-1 α y de sus genes diana que codifican para proteínas mitocondriales (Ndufs1, Sdha y Tfam) tanto en FRA como en células tubulares en cultivo estimuladas con TWEAK. Estudios funcionales *in vitro* e *in vivo* desvelaron la relación entre TWEAK y PGC-1 α . Los niveles de expresión de PGC-1 α y sus genes dianas están disminuidos en el FRA y esto depende de TWEAK. En células tubulares cultivadas TWEAK disminuye la expresión de PGC-1 α a través de la activación de NF κ B y de la deacetilación de histonas, lo que causa disfunción mitocondrial. La información obtenida en los estudios de esta tesis servirá en el futuro para diseñar aproximaciones terapéuticas que preserven la función mitocondrial y proteger el daño renal.

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is a potentially lethal condition for which no therapy is available beyond replacement of renal function, which can evolve to chronic kidney disease. The study of its pathogenic mechanisms may be relevant to design new therapeutic approaches. We hypothesized that an improved understanding of molecular mechanisms recruited by TWEAK, a cytokine that contributes to renal injury, may help to design new therapeutic approaches.

Post-translational histone modifications modulate gene expression and kidney injury. Histone crotonylation is a recently described post-translational modification. The first aim was to study the regulation and impact of a new type of post-translational histone modification, histone crotonylation, in kidney disease. Histone crotonylation was studied in cultured murine proximal tubular cells and in kidneys from mice with AKI induced by folic acid or cisplatin. Kidney tissue histone crotonylation increased during AKI and this was reproduced by exposure to TWEAK in cultured tubular cells. Specifically, ChIP-seq disclosed enrichment of histone crotonylation at the genes encoding the mitochondrial biogenesis regulator PGC-1 α and the sirtuin-3 deacetylase in both TWEAK-stimulated tubular cells and in AKI kidney tissue. Next step was to assess the role of crotonylation in kidney injury. Crotonate increased histone crotonylation *in vitro* and *in vivo*, and the expression of PGC-1 α and SIRT3, and decreased CCL2 expression in cultured tubular cells and healthy kidneys. Furthermore, systemic crotonate administration protected from experimental AKI. In this thesis, for the first time we have identified factors such as cell stress and crotonate availability that increase histone crotonylation *in vivo* and *in vitro*; and this increase may have a beneficial effect on AKI.

On the other hand, successful testing of mitochondria-targeted nephroprotective agents suggests a key role of mitochondrial injury in AKI. An improved understanding of the regulation of factors responsible for mitochondrial biogenesis may provide clues to novel therapeutic approaches to AKI. Thus, the second aim of this thesis was to explore the interaction between inflammation and mitochondrial biogenesis regulators.

Transcriptomics identified decreased expression of PGC-1 α mRNA and PGC-1 α -dependent genes encoding mitochondrial proteins (Ndufs1, SdhA and Tfam) as a shared feature between AKI and TWEAK-stimulated cultured tubular cells. Functional studies *in vivo* and cell culture studies characterized the TWEAK- PGC-1 α relationship. During AKI PGC-1 α target genes are downregulated and this is dependent on TWEAK. TWEAK decreases PGC-1 α and target gene expression in tubular cells through NF κ B activation and histone deacetylation, and lead to impairment of mitochondrial function. The information obtained in this thesis may be used to design therapeutic approaches that preserve mitochondrial function during kidney injury.

| | |
|--|----|
| CLAVE DE ABREVIATURAS | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1. El riñón. Fisiopatología..... | 2 |
| 1.1. El riñón | 2 |
| 1.2. El daño renal..... | 3 |
| 1.1. El fracaso renal agudo | 3 |
| 2. Búsqueda de biomarcadores y dianas terapéuticas mediante técnicas de alto rendimiento (técnicas -ómicas)..... | 5 |
| 2.1. Epigenética. Tecnología ChIP/ChIP-seq | 5 |
| 2.1. Transcriptómica. Tecnología de microarrays | 6 |
| 3. Modificaciones epigenéticas | 7 |
| 3.1 Epigenoma y modificaciones epigenéticas..... | 7 |
| 3.1 Tipos de modificaciones epigenéticas | 7 |
| a) Metilación del ADN | 8 |
| b) Modificaciones de histonas..... | 8 |
| - Acetilación de histonas..... | 9 |
| - Metilación de histonas..... | 9 |
| - Crotonilación de histonas | 10 |
| c) Interferencia de moléculas de ARN | 10 |
| d) La remodelación de los nucleosomas | 11 |
| 4. Superfamilia del TNF | 12 |
| 4.1. Factor de transcripción NF-κB..... | 12 |
| 4.2. TWEAK | 13 |
| 4.2.1. Actividad biológica de TWEAK | 14 |
| <u>Apoptosis</u> | 14 |
| <u>Proliferación</u> | 14 |
| <u>Inflamación</u> | 15 |
| 4.2.2. TWEAK en el fracaso renal agudo | 15 |
| 5. PGC-1α | 16 |
| 5.1. PGC-1α en el daño renal | 16 |
| 5.2. PGC-1α y TWEAK | 16 |
| 6. SIRT3 | 17 |
| 6.1. Actividad biológica de SIRT3 | 17 |
| 6.2. SIRT3 en el daño renal | 18 |
| 6.3. SIRT3 como enzima decrotonilasa | 18 |
| 7. SIRT3 y PGC-1α..... | 18 |

| | |
|---|----|
| II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 20 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| 1. Modelos experimentales | 21 |
| 1.1. Modelo experimental de fracaso renal agudo (FRA) | 21 |
| 1.1. Modelo experimental con TWEAK y anti-TWEAK | 21 |
| 1.1. Modelo experimental de crotonato y FRA | 22 |
| Análisis bioquímicos | 22 |
| 2. Experimentos in vitro..... | 23 |
| 2.1. Células en cultivo y reactivos | 23 |
| 2.2. Infecciones con adenovirus (Ad) | 23 |
| 3. Análisis genético | 24 |
| 3.1. Transcripción inversa y PCR a tiempo real | 24 |
| 3.2. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) | 25 |
| 3.3. Modelo experimental de cromatina-secuenciación (ChIP-seq)..... | 26 |
| 4. Array transcriptómico | 27 |
| 5. Análisis proteico | 27 |
| 5.1. Extracción de proteínas | 27 |
| 5.2. Extracción de histonas | 28 |
| 5.3. Western blot..... | 28 |
| 6. Inmunohistoquímica tisular | 29 |
| 6.1. Estudio de la presencia, niveles y localización de Crotonilación | 29 |
| 7. Análisis proteico | 29 |
| 7.1. Estudio de la localización celular de la Crotonilación | 29 |
| 7.2. Estudio de la localización de TWEAK y Fn14 en el tejido renal..... | 30 |
| 8. Citometría de flujo | 30 |
| 8.1. Caracterización de células apoptóticas | 30 |
| 8.2. Estudios de potencial de membrana mitocondrial (MMP) mediante TMRM | 31 |
| 9. Estadística | 31 |
| IV. RESULTADOS..... | 32 |
| 1. La crotonilación de histonas está aumentada en células tubulares renales murinas durante el fracaso renal agudo | 32 |
| 2. TWEAK aumenta la crotonilación de histonas en células tubulares renales de ratón en cultivo | 35 |
| 3. El crotonato aumenta la crotonilación de histonas y provoca respuestas biológicas en células tubulares de ratón en cultivo | 36 |

| | |
|---|----|
| 4. El crotonato aumenta la crotonilación de histonas y modula la expresión génica en el riñón murino | 39 |
| 5. El crotonato protege frente al FRA experimental | 42 |
| 6. TWEAK disminuye SIRT3 y el crotonato lo impide | 45 |
| 7. TWEAK disminuye PGC-1 α en el FRA | 46 |
| 8. Supresión de la transcripción de genes mitocondriales durante el FRA | 52 |
| 9. La administración de TWEAK xógeno disminuye la expresión de PGC-1 α in vivo | 55 |
| 10. TWEAK disminuye la expresión de PGC-1 α en células tubulares renales en cultivo | 55 |
| 11. Impacto negativo de TWEAK sobre la función mitocondrial a través de la disminución de PGC-1 α en células tubulares | 56 |
| 12. La disminución de PGC-1 α inducida por TWEAK está mediada por NF κ B | 58 |
| 13. TWEAK regula la expresión de PGC-1 α mediante mecanismos epigenéticos | 60 |
| V. DISCUSIÓN..... | 62 |
| 1. La crotonilación de histonas en el riñón y su posible contribución en el fracaso renal agudo..... | 62 |
| 2. TWEAK disminuye la expresión de PGC-1 α y empeora la función mitocondrial en el fracaso renal agudo | 66 |
| VI. CONCLUSIONES | 70 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA | 71 |
| VI. ANEXO..... | 89 |

Abreviaturas

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

| | |
|--------------------------------|--|
| Ad | Adenovirus |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| BCA | Ácido bicinconínico |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| BUN | Nitrógeno ureico |
| ChIP | Inmunoprecipitación de cromatina |
| DAB | Tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina |
| DAPI | 4'6-diamono-2-fenilindol |
| DPX | Resina acrílica con base de xileno |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido dietilentriamina pentaacético |
| Fn14 | Factor inducible por factores de crecimiento de fibroblastos-14 |
| FRA | Fracaso renal agudo |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| H ₂ O _{dd} | Agua di-destilada |
| HDAC | Histona deacetilasa |
| HRP | Peroxidasa de rábano |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| INF γ | Interferón γ |
| Kcr | Crotonilación de residuos lisina de histonas |
| lncARN | ARN largo no codificante |
| LPS | Lipopolisacárido bacteriano |
| MAPK | Quinasa activada por mitógenos |
| MCP-1 | Proteína quimiotáctica de macrófagos |
| MCT | Línea de células epiteliales de túbulo renal proximal de ratón |
| MMP | Potencial de membrana mitocondrial |
| ncRNA | ARN no codificante |
| NF- κ B | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PFA | Paraformaldehído |
| PFA | Paraformaldehído |
| Pfu | Unidades formadoras de placa |
| SFB | Suero fetal bovino |
| TBST | Buffer salino-Tris con Tween20 |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral α |
| TSA | Tricostatina A |
| TWEAK | Inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral |
| VPA | Ácido valproico |

I. INTRODUCCIÓN

1. El riñón. Fisiopatología

1.1. El riñón

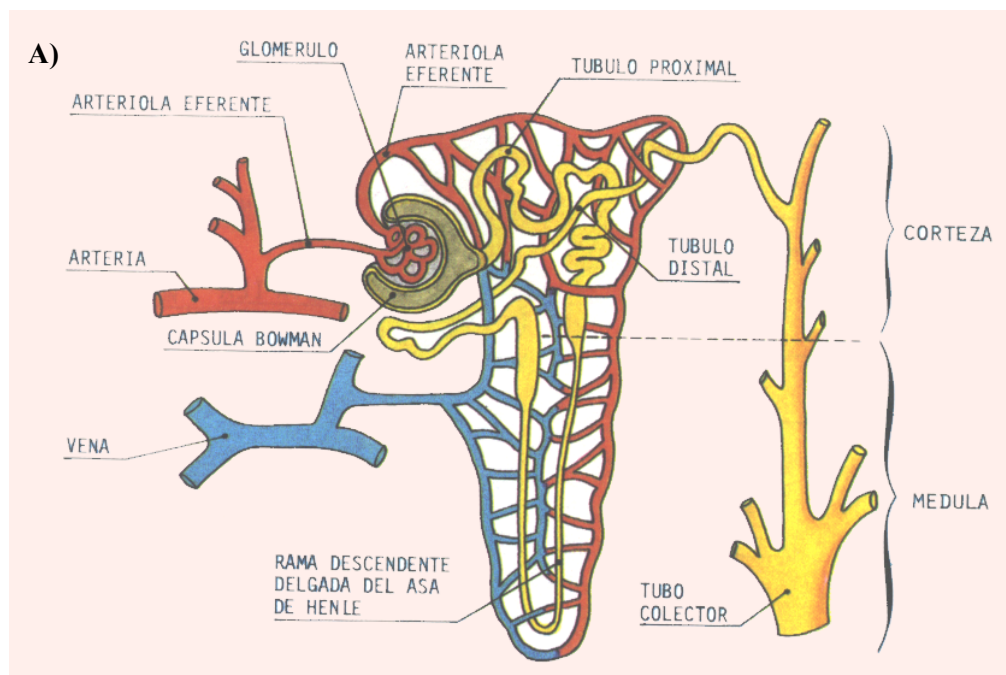
Los riñones son una par de órganos vitales que realizan funciones fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis del organismo. La principal función de los riñones es filtrar la sangre, pero los riñones además:

- Eliminan productos de desecho del metabolismo en forma de orina.
- Mantienen el equilibrio hidroelectrico y ácido-base.
- Secretan hormonas como la eritropoyetina (estimula y controla la producción de glóbulos rojos), renina (implicada en el sistema renina-angiotensina-aldosterona regulador del volumen extracelular y de la presión sanguínea) y vitamina D (se transforma en calcitriol que regula los niveles de calcio)

Cada riñón contienen alrededor de 1 millón de unidades de filtración microscópicas llamadas nefronas. La nefrona constituye la unidad estructural y funcional del riñón. Cada nefrona está formada a su vez por:

- Corpúsculo renal o de Malpighi: formado a su vez por el glomérulo y la cápsula de Bowman. Esta es la parte de la nefrona que filtra el plasma sanguíneo.
- Sistema tubular: formado a su vez por el túbulo contorneado proximal, segmento delgado y grueso del asa de Henle y túbulo contorneado distal. Esta es la parte de la nefrona que reabsorbe agua y sustancias e iones útiles para el cuerpo.

Los corpúsculos de Malpighi y los túbulos proximal y distal pertenecen a la zona del riñón denominada corteza, mientras que los dos segmentos del asa de Henle se localizan en la médula (**Figura 1**).



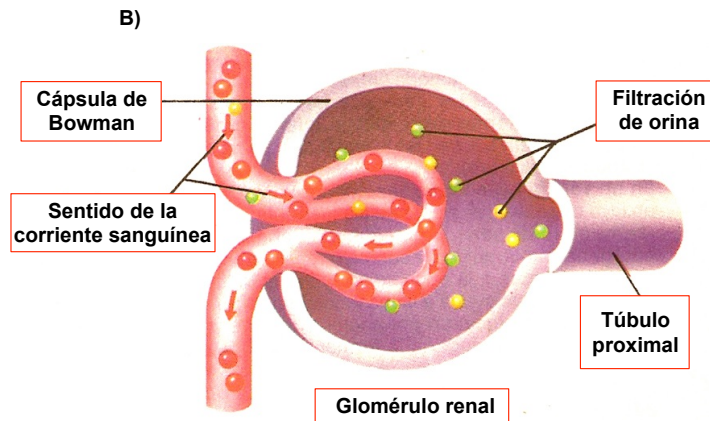


Figura 1. Estructura del riñón. A) localización cortical y medular de los componentes de la nefrona y del sistema de los conductos colectores. B) imagen microscópica del glomérulo.

1.2. El daño renal

En la actualidad, la clasificación de la mayor parte de las nefropatías sigue basándose en la naturaleza de la lesión inicial que afecta al parénquima renal: los glomérulos, los túbulos y el intersticio o los vasos. Según su evolución, las nefropatías se califican como agudas o crónicas y pueden causar fracaso renal agudo (FRA) o enfermedad renal crónica (ERC). La forma más frecuente de FRA es la lesión tubular. Además, la pérdida progresiva de la función renal se correlaciona con el daño tubular, independientemente del origen de la enfermedad (Remuzzi et al., 1997). La inflamación es un componente fundamental de daño renal (Remuzzi et al., 1997). Se produce como respuesta a la agresión, pero a su vez puede dañar el riñón. Cuando la intensidad y duración de la inflamación es exacerbada, acaba produciendo un daño crónico que disminuye la función renal para siempre. Las células tubulares renales juegan un papel importante en la inflamación (de Haij et al., 2002, González-Cuadrado et al., 1996) y producen citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión (van Kooten et al., 1999) que atraen células inflamatorias al riñón. La ERC predispone al FRA y el FRA agrava la ERC. Sin embargo, el tratamiento actual de la patología renal es insatisfactorio y no existe un tratamiento adecuado que disminuya la gravedad ni acelere la recuperación del daño renal. Por estas razones hemos centrado nuestros estudios en la búsqueda de alternativas terapéuticas para la lesión renal relacionadas con la inflamación y con las células tubulares renales.

1.3. El fracaso renal agudo

El FRA es un síndrome caracterizado por una brusca y normalmente transitoria disminución de la función renal. El FRA está asociado con una alta mortalidad y frecuentemente con una progresión hacia la ERC (Siew and Davenport, 2015). La causa más frecuente del FRA es la necrosis tubular aguda (Liaño and Pascual, 1996). A pesar del nombre, en la necrosis tubular aguda humana la forma más frecuente de muerte celular es la apoptosis (Olsen et al.,

1985, Solez et al., 1979). Los cambios morfológicos del FRA en el ser humano incluyen lesión y muerte celular, regeneración, inflamación y edema intersticial (Olsen et al., 1985). Actualmente, las opciones del nefrólogo para el tratamiento de la necrosis tubular aguda se limitan a sustituir la función renal mediante diálisis si es preciso, y no existen maniobras que permitan acelerar la recuperación funcional del riñón. En este sentido, la mortalidad del FRA está en torno al 50% desde hace más de 40 años.

Los riñones tienen la capacidad de recuperarse espontáneamente de un daño agudo si el paciente sobrevive. Durante el FRA, hay una primera fase de muerte de las células tubulares, seguido de una fase de regeneración celular y recuperación (Humes et al., 1995). Las células tubulares que permanecen en los túbulos después del daño proliferan para regenerar el epitelio tubular y recuperar la función renal. Las células madre también participan en la reparación tisular después de un daño (Maeshima et al., 2003).

Los modelos experimentales de FRA permiten abordar su patogenia en busca de nuevas alternativas terapéuticas. Una sobredosis de ácido fólico induce el FRA en los seres humano (Metz-Kurschel et al., 1990) y en los ratones (Ortega et al., 2006, Ortiz et al., 2000). El FRA experimental inducido por ácido fólico comparte con el FRA humano la presencia de apoptosis en las células tubulares, la proliferación compensatoria de estas células que conduce a la regeneración, la infiltración de células inflamatorias y, en una fase crónica, la fibrosis leve (Ortega et al., 2006, Ortiz et al., 2000). En el FRA por ácido fólico (Doi et al., 2006), al igual que en otras formas de FRA, están aumentados un gran número de citoquinas y quimioquinas que facilitan el infiltrado de leucocitos en el riñón (Ramesh and Reeves, 2002).

Durante un episodio de FRA hay un aumento de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF α (Zager and Johnson, 2009) y TWEAK (Sanz et al., 2008a) que activan la vía NF κ B. Esta respuesta inflamatoria, así como la fibrosis que condiciona transición a cronicidad parecen ser el resultado de una modificaciones epigenéticas (Naito et al., 2009, Bechtel et al., 2010). En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la crotonilación de histonas, una modificación epigenética descubierta recientemente y que muestra uno de los niveles de expresión más altos en el riñón (Tan et al., 2011), así como en la sirtuina-3 (SIRT3) recientemente descrita como decrotonilasa (Bao et al., 2014).

Por otro lado, la disminución del regulador de biogénesis mitocondrial PGC-1 α es un elemento causal de la disfunción renal que se produce durante la sepsis asociada al FRA (Stallons et al., 2014), y seguramente también en otros tipos de FRA. Por ello, en esta tesis hemos explorado la interacción entre inflamación y reguladores de la biogénesis mitocondrial tales como PGC-1 α .

2. Búsqueda de biomarcadores y dianas terapéuticas mediante técnicas de alto rendimiento (técnicas –ómicas)

Tradicionalmente, la búsqueda de mediadores de daño tisular entrañaba una revisión cuidadosa de la literatura a la búsqueda de nuevas moléculas con características que pudieran ser relevantes en la lesión renal. Con este abordaje técnico se identificaban moléculas de interés potencial y se estudiaba su expresión en la lesión. Si existían diferencias entre el tejido normal y dañado, se procedía a un análisis funcional en células cultivadas y en modelos animales. Este proceso es poco eficaz y consume muchos recursos. En 1986, Thomas Roderick definió el término “genómica” para describir las diferentes disciplinas de mapeo, secuenciación y análisis del genoma (conjunto de genes de un organismo). A finales de los 90 se completaron los primeros genomas de organismos eucariotas siendo la culminación de todos los estudios la secuenciación del genoma humano (Venter et al., 2001). La época postgenómica ha desarrollado una serie de metodologías experimentales destinadas a estudiar la información derivada de las secuencias genómicas para caracterizar su funcionalidad biológica. Es lo que se denomina “genómica funcional”. Actualmente la genómica funcional se encuentra dividida en cuatro ramas: el conocimiento del genoma, del transcriptoma (conjunto de moléculas de ARNm), del proteoma (conjunto de proteínas) y del metaboloma (conjunto de metabolitos de bajo peso molecular).

2.1. Epigenética. Tecnología ChIP/ ChIP-seq

El genoma es el contenido de ADN presente en una célula u organismo, y el ADN es la molécula que contiene la información genética y la sustancia de la cual están hechos los genes. De este modo, se define un gen como el fragmento de ADN que contiene toda la información necesaria para la síntesis de un polipéptido.

Pues bien, la epigenética representa el siguiente paso en el conocimiento de la regulación genética en condiciones de salud y enfermedad. Se define epigenética como la ciencia que estudia cambios heredables en los patrones de expresión génica que no están causados por la alteración de la secuencia de nucleótidos (Beckerman et al., 2014). El término epigenética (del griego *epi* que significa sobre) fue acuñado por Conrad Hal Waddington en 1942 para referirse al estudio de las interacciones entre genes y ambiente (Devaskar and Raychaudhuri, 2007, Jaenisch and Bird, 2003), y así explicar fenómenos cuyo entendimiento excedía la genética clásica (Martín-Subero and Esteller, 2011). La epigenética permite añadir una gran dosis de indeterminismo a la genética, reforzando la importancia del ambiente en relación con la expresión de genes y sus variaciones a lo largo de la vida. Analiza cambios reversibles del ADN que hacen que unos genes se expresen o no dependiendo de condiciones externas como la dieta, enfermedades, fármacos, toxinas y hábitos tóxicos, y el envejecimiento. A pesar de que la información genética permanece constante durante el desarrollo, la

información epigenética varía durante la diferenciación celular, en respuesta a gran variedad de factores (incluyendo acciones intercelulares y señales extracelulares). Esta herencia alternativa viene fijada porque los genes se expresan o no, dependiendo de ciertas condiciones bioquímicas como la metilación del ADN, la acetilación de histonas, la forma de la cromatina y otras causas que aún no conocemos. Los dispositivos epigenéticos son las cubiertas bioquímicas que lleva el ADN. Así cabe destacar que la metilación del ADN es la modificación epigenética fundamental que regula la expresión génica y la estabilidad de los cromosomas. Esta y otras modificaciones epigenéticas controlan la actividad genética, cambiando la estructura tridimensional de los cromosomas. Tenemos por lo tanto un código genético, pero también un código epigenético constituido por un sistema de moléculas unidas al complejo ADN/histonas, que gobiernan la expresión de nuestros genes. Entender el epigenoma es clave para comprender la regulación génica específica de cada tipo celular tanto en condiciones basales como en la enfermedad (Ernst and Kellis, 2013). El epigenoma se ha convertido en un importante mediador de los efectos de programación a largo plazo ejercidos por la exposición ambiental, y múltiples evidencias apuntan hacia el epigenoma como un importante eslabón perdido en nuestra comprensión del desarrollo de la enfermedad renal (Susztak, 2014).

La epigenómica implica el estudio de las modificaciones epigenéticas en el genoma celular. Estas modificaciones pueden ser del ADN o de las histonas. En esta tesis hemos utilizado un abordaje epigenómico mediante la técnica ChIP y ChIP-seq. Estas técnicas proporcionan una imagen de las interacciones proteína-ADN que se producen en el interior del núcleo de las células. La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) es un método usada para determinar la ubicación de los sitios de unión al ADN en el genoma de la proteína de interés. El *ChIP-Sequencing* (ChIP-seq) combina la técnica ChIP con la secuenciación del ADN a gran escala, lo que ofrece una alta sensibilidad y la caracterización precisa de las interacciones proteína-ADN de un genoma completo. Se emplean anticuerpos específicos que pueden inmunoprecipitar factores de transcripción y otras proteínas asociadas a la cromatina del ADN genómico. La secuenciación del ADN inmunoprecipitado nos permite identificar los sitios del ADN a los que se une un factor de transcripción concreto para regular la expresión de un conjunto de genes relacionados con una función o proceso, así como el estado de metilación, acetilación, *etc.* del genoma.

2.2. Transcriptómica. Tecnología de microarrays

La transcriptómica es una técnica de alto rendimiento que permite la cuantificación de la expresión de miles de genes. Las técnicas basadas en chips de ADN (microarrays) permiten monitorizar el transcriptoma de un modo rápido y reproducible (Khan et al., 2005).

La transcriptómica implica el manejo simultáneo de miles de datos, lo que se logra mediante herramientas bioinformáticas y bioestadísticas. Estas técnicas implican un control de

calidad de los datos con normalizaciones para eliminar la variabilidad sistémica introducida por el proceso técnico. La metodología del análisis pretende buscar genes diferencialmente expresados entre las diferentes muestras.

En esta tesis hemos utilizado un abordaje transcriptómico como método para identificar nuevos genes implicados en el FRA que pudieran servir como biomarcadores o dianas terapéuticas. En concreto nos hemos centrado en PGC-1 α , cuya expresión fue significativamente diferente entre las muestras de FRA y los riñones control, y se correlacionan bien con la expresión de Fn14, el receptor de TWEAK. Nuestro laboratorio tiene una larga experiencia en el estudio del papel de TWEAK en la patogenia del daño renal y está desentrañando los mecanismos moleculares y su contribución al daño renal (Ortiz et al., 2011, Sanz et al., 2008b, Sanz et al., 2011).

3. Modificaciones epigenéticas

3.1. Epigenoma y modificaciones epigenéticas

Como ya hemos dicho, el término epigenética se refiere a cambios heredables en los patrones de expresión génica que no están causados por la alteración de la secuencia de nucleótidos (Beckerman et al., 2014). Esta información tiene que ser heredable, se tiene que poder auto-perpetuar, pero también debe ser reversible. Las modificaciones de las citosinas del ADN claramente cumplen estos criterios y por eso está considerado el mecanismo epigenético clave. Además, las modificaciones de histonas y los ARNs no codificantes son también parte del epigenoma. Partiendo de la disponibilidad de factores de transcripción, el epigenoma es el determinante clave del resultado transcripcional, permitiendo que ciertos genes se expresen y que otros no tengan acceso a los factores de transcripción.

3.2. Tipos de modificaciones epigenéticas

Diferentes células responden de forma muy diferente a las señales ambientales. Por ejemplo, tras la estimulación con TWEAK (una citoquina de la superfamilia de TNF) ciertas células pueden morir, proliferar, migrar o diferenciarse dependiendo del microambiente que las rodea (Izquierdo et al., 2012). La base estructural de esto es que el ADN está presente en el núcleo de una forma muy organizada. Unas pequeñas proteínas llamadas histonas (isoformas H1- 4) envuelven el ADN y guían la unión de los factores de transcripción. Las modificaciones del ADN, sin variar la secuencia de nucleótidos, o de las colas de las histonas, son reguladores claves de la expresión génica.

Se han descrito más de 100 tipos diferentes de modificaciones epigenéticas incluyendo metilación, acetilación, fosforilación, sumoilación, ubiquitinación y crotonilación (Susztak, 2014). En 2011, Tan M *et al* publicaron el descubrimiento de 67 nuevas modificaciones de

histonas nunca antes descritas aumentando así el número de modificaciones de histonas en torno al 70% (Tan et al., 2011).

Las diferentes modificaciones epigenéticas consisten en cuatro mecanismos que cooperan de forma integrada para determinar los estados fisiológicos de la expresión de los genes. Estos 4 mecanismos son:

- a) Metilación del ADN
- b) Modificaciones de histonas
- c) Interferencia de moléculas de ARN (micro-ARN, miRNA, siRNA) asociado al silenciamiento de los genes.
- d) Remodelación de los nucleosomas

a) Metilación del ADN

La metilación del ADN es la modificación epigenética mejor entendida. Es un marcaje químico que consiste en la adición de un grupo metilo al carbono en posición 5 de las citosinas (5mC) en los sitios CpG (-C-fosfato-G-) (Mohtat and Susztak, 2010). La mayoría de CpGs (70-80%) están metilados en el genoma. Las enzimas responsables de la metilación son las ADN metiltransferasas (Dnmt). Dnmt1 es considerada como la metiltransferasas de mantenimiento, mientras que Dnmt3a y 3b actúan como metiltransferasas de *novo* (Mohtat and Susztak, 2010). Por otro lado, la desmetilación del ADN puede ser un proceso activo o pasivo. La desmetilación pasiva es mediada por la reducción en la actividad de las enzimas metiltransferasas durante la replicación del ADN. Para la desmetilación activa se han descrito dos procesos principales. El primero implica proteínas tales como la timina ADN glicosilasa o la activación inducida de desaminasas que produce un desemparejamiento de las bases, que será reconocido y eliminado por ADN glicosilasas y diferentes mecanismos de reparación del ADN. El segundo proceso emplea modificaciones 5mC principalmente llevadas a cabo por proteínas translocadoras (Ko et al., 2010), y no está directamente asociado con la reparación del ADN (Beckerman et al., 2014).

b) Modificaciones de histonas

Las histonas pueden ser modificadas postraduccionalmente de varias maneras para reestructurar la cromatina (Kouzarides, 2007, Martin and Zhang, 2005, Susztak, 2014). De hecho, la hipótesis de “el código de histonas” postula que la combinación de diferentes modificaciones de histonas podría regular la estructura de la cromatina y su estado transcripcional (Strahl and Allis, 2000).

Las modificaciones en los residuos de lisina en posición 4, 5, 27 y 36 de la histona-3 (H3) parecen tener especial importancia como reguladores claves de la expresión génica. Hay al menos 8 tipos de modificaciones postraduccionales de histonas: metilación de lisinas o argininas, acetilación de lisinas, fosforilación de serinas o treoninas, ubiquitinación y

sumoilación de lisinas (Kouzarides, 2007, Martin and Zhang, 2005) (**Tabla 1**) y crotonilación de lisinas (Tan et al., 2011); y hay más de 60 residuos diferentes en los cuales podemos detectar estas modificaciones (Rodríguez-Romo et al., 2015). La metilación y acetilación de los residuos lisina de las histonas H3 (H3K4, H3K27, H3K9) son las modificaciones más comúnmente estudiadas.

- **Acetilación de histonas**

La acetilación de histonas está asociada con la activación de la transcripción. La acetilación es una de las modificaciones de histonas más frecuente. Normalmente ocurre en residuos lisina por la adición enzimática de un grupo acetilo (COCH_3) desde el acetil coenzima A, al extremo N-terminal del residuo lisina que sobresale del núcleo de histonas del nucleosoma (Ramakrishnan et al., 2013). Las enzimas involucradas en la acetilación de histonas son las acetiltransferasas (HATs), que desempeñan un papel crítico en la acetilación de las histonas H3 y H4. La acetilación de la histona H3 aumenta con la inhibición de las desacetilasas de histonas (HDACs) y disminuye con la inhibición de las HAT. Las HDACs, tales como la sirtuina-3, catalizan la eliminación de un grupo acetilo en los residuos lisina de las histonas.

- **Metilación de histonas**

Se define la metilación de histonas como la transferencia de uno, dos o tres grupos metilos desde S-adenosil-L-metionina a los residuos lisina o arginina de las histonas, catalizado por las enzimas metiltransferasas de histonas (HMTs). Las HMTs son enzimas tanto del tipo lisina metiltransferasas como arginina metiltransferasas. La metilación de lisinas y argininas en las histonas H3 y H4 puede activar o reprimir la activación transcripcional (Kouzarides, 2007, Carrozza et al., 2005, Cuthbert et al., 2004, Joshi and Struhl, 2005, Keogh et al., 2005, Lee et al., 2005). Las desmetilasas de histonas eliminan grupos metilo en histonas modificadas y al igual que las HMTs, activan o reprimen la transcripción (Kouzarides, 2007, Shi et al., 2004, Metzger et al., 2005).

| Residuo modificado | Modificación epigenética | Enzima | Funciones reguladas |
|-----------------------|--------------------------|---|--|
| K-ac | Acetilación | Acetiltransferasa | Transcripción, reparación, replicación, condensación |
| K-me1, K-me2, K-me3 | Metilación (lisina) | Lisina metiltransferasa | Transcripción, reparación |
| R-me1, R-me2a, R-me2s | Metilación (argininas) | Arginina metiltransferasa | Transcripción |
| S-ph, T-ph | Fosforilación | Fosforilasa | Transcripción, reparación, condensación |
| K-ub | Ubiquitinación | Ubiquitinasa | Transcripción, reparación |
| K-su | Sumoilación | SUMO (<i>small ubiquitin-like modifier</i>) | Transcripción |

Tabla 1. Tipos de modificaciones epigenéticas de histonas.

- **Crotonilación de histonas**

Estudios recientes identificaron la crotonilación de histonas (Kcr) como una nueva modificación postraduccional de histonas conservada evolutivamente y presente en varios tejidos somáticos de ratones adultos (Tan et al., 2011). Actualmente se sabe muy poco sobre la regulación y función de la crotonilación de histonas.

La hipótesis es que la crotonilación de histonas consistiría en la transferencia de un grupo crotonilo desde el crotonil coenzima A (Crotonil-CoA) al extremo N-terminal del residuo lisina (Lys) que sobresale del núcleo de histonas, catalizado por la enzima acetil transferasa p300 (Ogryzko et al., 1996) que funcionaría en este momento como crotonil transferasa (Sabari et al., 2015). Para esto, el butiril coenzima A o el glutaril coenzima A se oxidarían a través de múltiples pasos hasta crotonil coenzima A, el cual cedería este grupo crotonilo (Tan et al., 2011) (**Figura 2**). Además, se ha descrito que el crotonato, un ácido carboxílico insaturado de cadena corta ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$), aumenta la crotonilación de histonas en células en cultivo (Tan et al., 2011, Sabari et al., 2015) pero su efecto *in vivo* aún no se ha estudiado. Recientemente se ha identificado que la desacetilasa de histonas sirtuina-3 (SIRT3) (Nogueiras et al., 2012) tiene también función decrotonilasa (Bao et al., 2014).

La crotonilación de histonas es mecanística y funcionalmente diferente a la acetilación de histonas (Tan et al., 2011, Sabari et al., 2015). Está presente en varios tejidos somáticos de ratones adultos siendo el riñón uno de los tejidos con mayores niveles de crotonilación (Tan et al., 2011), lo que sugiere que podría estar implicada en la regulación epigenética de la expresión de genes durante el daño renal. Por ello, en esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la crotonilación de histonas, tanto *in vitro* como *in vivo*, como modificación epigenética con una posible función moduladora en el daño renal.

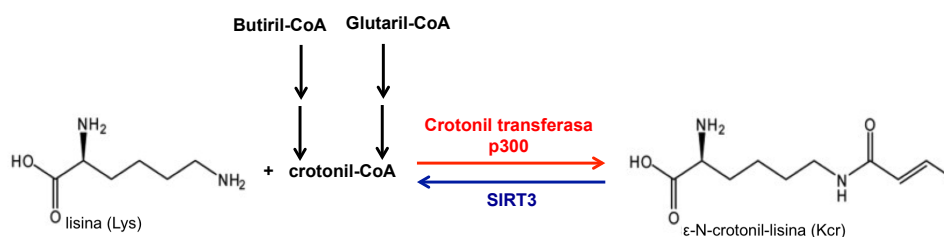


Figura2. Esquema del mecanismo de crotonilacion.

c) Interferencia de moléculas de ARN

Recientes investigaciones han permitido conocer la relación existente entre la metilación del ADN y la modificación de histonas, demostrando además la participación

potencial de pequeñas moléculas de ARN (Novina and Sharp, 2004) generadas por la maquinaria de interferencia del ARN (Jia et al., 2004).

Un ARN no codificante (ncRNA) es una molécula de ARN funcional, que no se traduce en una proteína. Estos ncRNA constituyen la mayoría del transcriptoma, pertenecen a diversos grupos y llevan a cabo diferentes funciones. Cabe destacar los micro-RNA (miRNAs) y los ARN largos no codificantes (lncRNAs), que regulan la expresión de miles de genes (Peschansky and Wahlestedt, 2014).

Los micro-ARN (miRNA) conforman una familia de ARNs de interferencia no codificantes de pequeño tamaño que regulan negativamente la expresión de genes a nivel postranscripcional. La acción de los ARN de interferencia (ARNi) se considera como un mecanismo epigenético adicional que interfiere la expresión genética por conducir a la degradación de los transcritos de secuencia complementaria producidos, e interferir o impedir su traducción a proteínas. Estas pequeñas moléculas de ARN dirigen la acción de ARNasas que intervienen en la eliminación de los transcritos, y pueden servir también como cebadores para la producción de precursores de moléculas de ARN de doble cadena (ARNds) que se utilizan en la producción de ARNs más pequeños bajo la acción de la transcriptasa inversa o polimerasa ARN dependiente. Por lo tanto, los ARN de interferencia representan un tipo de estado metabólico que puede afectar a los estados de expresión génica sin cambios en las secuencias del ADN. El silenciamiento de los estados post-transcripcionales mediados por los ARNi no se heredan de forma estable a través de la meiosis, por lo que constituyen por si mismos un mecanismo importante para la variación epigenética heredada.

La expresión de lncRNAs está regulada durante el desarrollo, pueden ser específicos de un tejido o un tipo celular, y pueden variar espacial, temporalmente o en respuesta a un estímulo. Su localización puede ser nuclear y/o citoplasmática (Derrien et al., 2012). Hasta la fecha muy pocos lncRNAs han sido caracterizados en detalle. Sin embargo, está claro que los lncRNAs son importantes reguladores de la expresión génica, y pueden activarla o inhibirla (Johnsson et al., 2013, Mattick and Rinn, 2015, Peschansky and Wahlestedt, 2014, Wilusz et al., 2009, Wang and Chang, 2011).

d) La remodelación de los nucleosomas

El nucleosoma es la formación nuclear del ADN enrollado alrededor de las histonas (octámero de histonas), y constituye el nivel más simple de estructura cromatínica. Esta estructura tiene una gran importancia para la expresión de los genes dado que la forma en que está compactada la fibra de cromatina es determinante para la capacidad de expresión del ADN (**Figura 3**). Para la transcripción es preciso un estado relajado, con el fin de que puedan adherirse los factores proteicos y las polimerasas a los promotores de los genes que han de expresarse.

Los nucleosomas se descondensan y relajan como consecuencia de la disminución de afinidad entre el ADN y las histonas, y esto es debido a la acetilación de estas proteínas. La metilación del ADN no es suficiente para inducir la modificación de las histonas en el modo de silenciamiento génico, pero las proteínas de unión metil-CpG (MBD) desencadenan el reclutamiento de las enzimas de remodelación de la cromatina, y en particular de las desacetilasas de histonas (HDACs). La transformación se produce por el efecto de estas HDACs que provocan la eliminación de los grupos acetilo en los extremos N-terminal de los residuos lisinas de la cola de las histonas, lo que finalmente promueve el empaquetamiento del ADN característico de la heterocromatina inactiva (Wade, 2001, Ballestar and Wolffe, 2001).

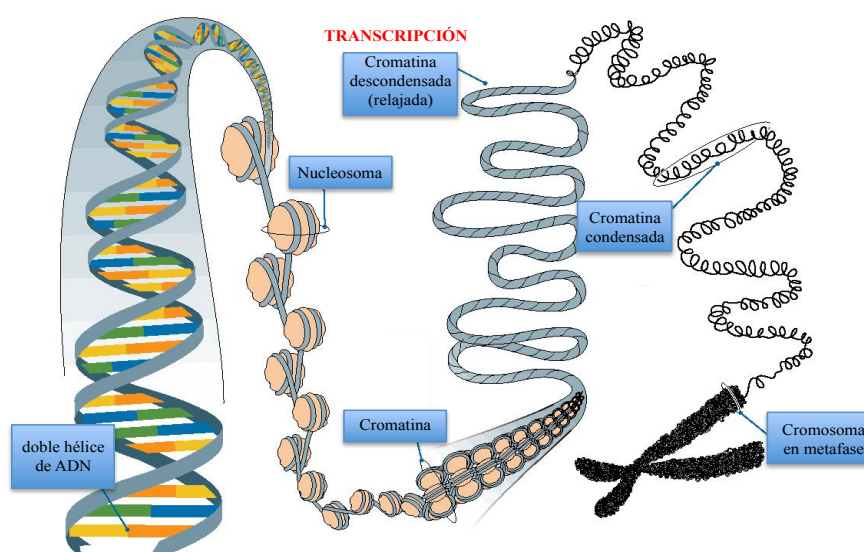


Figura 3. Estructura de la cromatina.

4. Superfamilia del TNF

El factor de necrosis tubular (TNF) fue descubierto casualmente por William Coley (1893) y fue aislado y clonado hace 32 años (Aggarwal et al., 1985, Pennica et al., 1984, González-Cuadrado et al., 1996, Yap and Lee, 2012). Esta molécula se convirtió en el prototipo de una familia de 20 proteínas con características en común conocidas como la superfamilia del TNF (TNFSF). La unión de los ligandos de la TNFSF a sus receptores (TNFRSF) juega un papel crucial en muchos procesos biológicos fundamentales, incluyendo la apoptosis, la diferenciación celular, y la inflamación (Burkly et al., 2007).

4.1. Factor de transcripción NF- κ B

Muchas de las acciones de esta superfamilia TNF están relacionadas con la activación del factor de transcripción NF- κ B. El factor nuclear NF- κ B es una familia de factores de transcripción pleiotrópicos que controlan e integran una compleja red de estímulos extracelulares y vías de señalización, que regulan transcripcionalmente cientos de genes dependiendo del

contexto, el estímulo y el sistema celular (Sanz et al., 2010b, Poveda et al., 2013). NF- κ B se puede activar por la vía clásica/canónica, la vía alternativa/no canónica y una vía híbrida de las dos anteriores (Bonizzi et al., 2004, Hayden and Ghosh, 2008, Wan and Lenardo, 2009) (**Figura 3**).

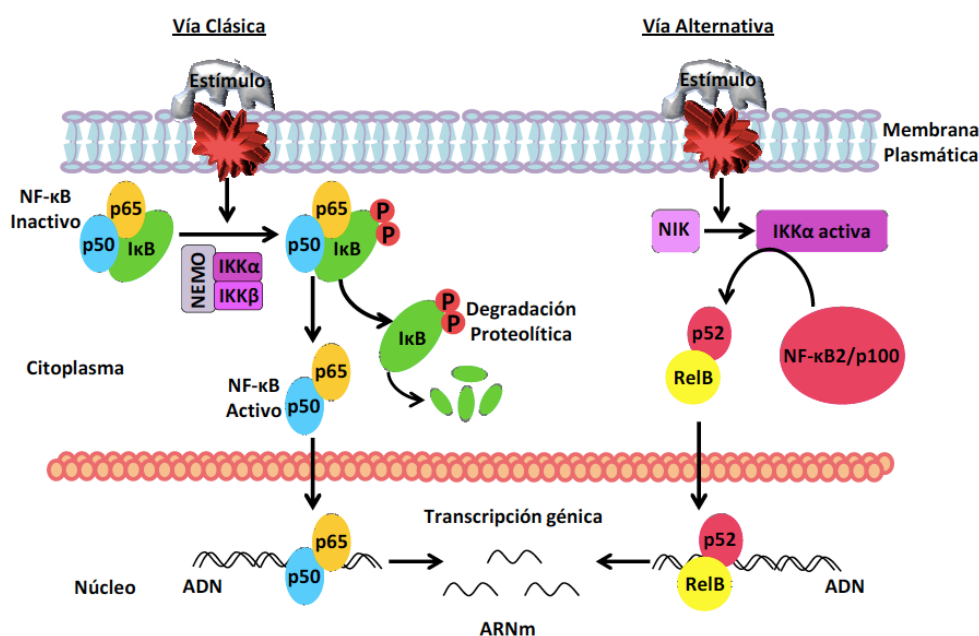


Figura 3. Esquema representativo de la vía clásica y alternativa de activación de NF- κ B.

TNF y TWEAK son citoquinas proinflamatorias de la superfamilia del TNF que activan la vía clásica de NF- κ B. Ambas, TNF y TWEAK han sido estudiadas en el riñón y están involucradas en el daño renal (Justo et al., 2006, Lorz et al., 2000, Misseri et al., 2005). Sin embargo, solo algunas citoquinas activan la vía alternativa. Entre ellas está TWEAK pero no TNF (Poveda et al., 2013).

4.2. TWEAK

El factor inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK/TNFSF12) es una citoquina de la superfamilia del TNF que activa al receptor Fn14 (factor inducible por factores de crecimiento de fibroblastos-14/TNFRSF12) y que fue identificada en 1997 (Chicheportiche et al., 1997).

TWEAK se expresa en numerosos tejidos y se puede encontrar a niveles elevados en el páncreas, intestino, corazón, cerebro, pulmón, ovario, sistema vascular y músculo esquelético, y a niveles más bajos en hígado y riñón (Chicheportiche et al., 1997). Sin embargo, las fuentes precisas del TWEAK soluble (TWEAKs) circulante no están claras. Estudios funcionales en

animales de experimentación han implicado a TWEAK como promotor del daño renal y existen anticuerpos anti-TWEAK en fase de ensayo clínico (Sanz et al., 2014).

4.2.1. Actividad biológica de TWEAK

TWEAK tiene múltiples funciones con relevancia fisiopatológica que dependen del microambiente, del tipo de célula y del estado de activación celular. TWEAK puede regular la muerte, proliferación, migración y diferenciación celular, la inflamación, la regeneración de tejidos y la neoangiogénesis (Jakubowski et al., 2005, Lynch et al., 1999, Maecker et al., 2005, Mittal et al., 2010, Nakayama et al., 2003, Naumann et al., 1993, Novoyatleva et al., 2010, Tiller et al., 2009, Tran et al., 2005, Wang et al., 2010). TWEAK activa tanto la vía clásica/canónica de NF- κ B como la vía alternativa/no canónica (Hayden and Ghosh, 2008, Bonizzi et al., 2004, Wan and Lenardo, 2009). En células renales TWEAK puede desempeñar diversas funciones que resumimos a continuación.

Apoptosis: TWEAK tiene una débil capacidad para inducir apoptosis y requiere de largos periodos de incubación y coestimulación con agentes sensibilizantes como el interferón (INF) γ para inducir apoptosis (Nakayama et al., 2000).

En el riñón, TWEAK es capaz de inducir apoptosis de forma débil en células mesangiales, y este efecto se magnifica si se estimula antes con INF γ (Campbell et al., 2006). TWEAK no induce apoptosis en células tubulares no estresadas pero sí cuando activa Fn14 en un ambiente inflamatorio formado por la combinación de TNF α e INF γ (Justo et al., 2006). A través de este mecanismo TWEAK podría facilitar la apoptosis tubular durante el FRA ya que la expresión de TWEAK, TNF α e INF γ está aumentada en esta patología (Justo et al., 2006).

Proliferación: La proliferación inducida por TWEAK depende del tipo celular y del ambiente en el que está inmersa la célula (Desplat-Jégo et al., 2002, Donohue et al., 2003, Lynch et al., 1999, Novoyatleva et al., 2010, Tirnitz-Parker et al., 2010). En el riñón, TWEAK también induce la proliferación de células mesangiales, fibroblastos renales, podocitos y células tubulares proximales humanas y murinas. Este efecto de TWEAK está mediado por la unión a su receptor Fn14 y por el factor de transcripción NF- κ B (Justo et al., 2006, Sanz et al., 2009). Tanto el suero como las citoquinas inflamatorias aumentan la expresión de Fn14 pero facilitan respuestas opuestas a TWEAK: proliferación y apoptosis, respectivamente (Sanz et al., 2009, Ucero et al., 2013) (Sanchez-Niño et al., 2012, Ucero et al., 2013, Justo et al., 2006, Sanz et al., 2009). La inducción de proliferación mediada por TWEAK en células tubulares requiere la colaboración de ERK1/2, p38 MAPK, fosfoinositol 3-quinasa/Akt, y NF- κ B; y la disrupción de alguna de estas vías previene la proliferación (Ucero et al., 2013).

Inflamación: Múltiples indicios implican a TWEAK como mediador de la inflamación. El efecto proinflamatorio de TWEAK se ha estudiado en detalle en las células tubulares renales (de Haij et al., 2002, Sanz et al., 2008a, van Kooten et al., 1999). La unión de TWEAK a Fn14 activa rápidamente la vía canónica de NF- κ B (Sanz et al., 2008a). TWEAK también puede activar la vía no canónica de NF- κ B (RelB/ NF- κ B2) de manera más tardía induciendo la expresión de CCL21 y CCL19 (Saitoh et al., 2003, Sanz et al., 2010a). Además, TWEAK tiene un efecto sinérgico con las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) en promover la expresión de genes inflamatorios en las células tubulares (Muñoz-García et al., 2009). TWEAK también estimula la producción de CCL2, RANTES, CXCL10 y CXCL1 en células mesangiales cultivadas y en podocitos (Campbell et al., 2006, Gao et al., 2009).

El efecto proinflamatorio de TWEAK en el riñón también se observa *in vivo*. La administración sistémica de TWEAK induce la activación de las vías canónica y no canónica de NF- κ B en las células tubulares renales, la expresión tubular de quimioquinas e infiltración intersticial por macrófagos y células T (Sanz et al., 2008a, Sanz et al., 2010a, Gao et al., 2009, Campbell et al., 2006). Los ratones deficientes de TWEAK presentan menos infiltrado de macrófagos tras un FRA inducido por sobredosis de ácido fólico (Sanz et al., 2008a). TWEAK también disminuye la expresión de genes nefroprotectores como Klotho a través de un mecanismo dependiente de NF- κ B, lo que podría explicar parcialmente la relación entre la inflamación y las enfermedades que se caracterizan por un envejecimiento acelerado (Poveda et al., 2013, Sanz et al., 2010a, Moreno et al., 2011).

4.2.2. TWEAK en el fracaso renal agudo

La inflamación y la muerte celular contribuyen de manera clave en el FRA (Linkermann et al., 2014, Garcia-Cenador et al., 2013). A este respecto, TWEAK contribuye de manera clave en el FRA y en el daño renal en general (Ortiz et al., 2011, Sanz et al., 2011).

En el FRA experimental inducido por ácido fólico, TWEAK y su receptor Fn14 están aumentados (Justo et al., 2006, Zheng et al., 2006). Estudios funcionales han revelado un papel clave de TWEAK tanto en el FRA experimental inducido por ácido fólico como en el FRA causado por isquemia reperusión renal. El bloqueo de TWEAK *in vivo* permite estudiar su función en el microambiente del FRA. Los anticuerpos neutralizantes anti-TWEAK o deficiencia genética de TWEAK en ratones knock-out (TWEAK KO) protegen del FRA inducido por ácido fólico conservando la función renal y disminuyen la apoptosis tubular, la expresión tubular de quimioquinas (MCP-1, RANTES, CCL21 y CXCL16) y la inflamación intersticial por macrófagos y linfocitos T (Sanz et al., 2008a, Sanz et al., 2009, Sanz et al., 2010a). Este efecto protector, es en general, más evidente a las 72 horas que a las 24 horas, lo que sugiere que el daño tisular inicial recluta TWEAK para amplificar la respuesta inflamatoria, el daño renal y la disfunción renal. A día 7 la función renal se recupera (Sanz et al., 2011).

Además, el bloqueo de Fn14, también disminuye la lesión tubular en otro modelo diferente de FRA inducido por isquemia-reperfusión renal, donde se redujo la apoptosis de las células renales y la inflamación (Hotta et al., 2011). Por lo tanto, el bloqueo preventivo de TWEAK o Fn14 protege del FRA experimental, y la infiltración de células inflamatorias en el FRA depende de la expresión local de citoquinas inflamatorias.

5. PGC-1 α

El coactivador α del receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR γ) (PGC-1 α) es un miembro de una pequeña familia de reguladores de transcripción que controla la expresión de genes involucrados en la homeostasis energética, biogénesis mitocondrial, oxidación de ácidos grasos y metabolismo de la glucosa. PGC-1 α es esencial tanto para la función mitocondrial como para la expresión de proteínas mitocondriales claves (Rato et al., 2014).

5.1. PGC-1 α en el daño renal

La disminución de PGC-1 α es un elemento causal de la disfunción renal que se produce durante la sepsis asociada al FRA (Stallons et al., 2014). Durante la sepsis renal la expresión de PGC-1 α disminuye proporcionalmente al grado de disfunción renal y vuelve a los niveles iniciales cuando la función renal se normaliza (Stallons et al., 2014). Sin embargo, la sepsis es una forma específica de FRA en la cual el grado de disfunción es desproporcionado con relación al daño morfológico e histológico. Así en esta tesis, nosotros hemos explorado la expresión de PGC-1 α en la nefropatía experimental causada por ácido fólico, como un modelo de daño renal que comparte con el FRA humano el desarrollo de una amplia muerte celular, el infiltrado inflamatorio intersticial y la proliferación de las células tubulares que restaure la masa celular tubular (Funk and Schnellmann, 2012).

5.2. PGC-1 α y TWEAK

Recientemente se ha descrito que la disminución de PGC-1 α media los efectos deletéreos de TWEAK en la enfermedad cardíaca y en la atrofia muscular esquelética. En este sentido, TWEAK disminuye la expresión de PGC-1 α en cardiomiocitos y músculo esquelético (Shi et al., 2013, Hindi et al., 2014). En las células renales, la activación de la vía NF- κ B por TWEAK aumenta la expresión de genes proinflamatorios pero también disminuye la expresión de genes nefroprotectores como Klotho (Poveda et al., 2013, Sanz et al., 2010a, Moreno et al., 2011). Como PGC-1 α parece desempeñar un papel clave en la protección renal, nosotros hipotetizamos que TWEAK podría también regular a la baja la expresión de PGC-1 α en el riñón, y en esta tesis abordamos esta hipótesis.

6. SIRT3

La Sirtuina 3 (SIRT3) es una enzima desacetilasa de histonas (Nogueiras et al., 2012) recientemente identificada también como decrotonilasa (Bao et al., 2014). SIRT3 es miembro de la familia de las sirtuinas, una clase de enzimas desacetilasas de histonas NAD-dependientes, (Huang et al., 2010, Scher et al., 2007) que afectan al metabolismo celular regulando la expresión de ciertos genes de la familia FoxO, cMYC, hTERT, p53, NF- κ B y PGC-1 α entre otros. La activación o silenciamiento de estos genes es importante en los procesos de apoptosis, reparación y muerte celular (Shechter et al., 2007, Iwahara et al., 2012). La familia de las sirtuinas está evolutivamente conservada y agrupa 7 tipos diferentes de desacetilasas de histonas (SIRT1-SIRT7), 3 de las cuales se localizan principalmente en la mitocondria (SIRT3-SIRT5). SIRT3 se expresa en el riñón y en otros tejidos metabólicamente activos tales como cerebro, corazón, hígado y tejido adiposo marrón.

6.1. Actividad biológica de SIRT3

En los últimos tiempos SIRT3 ha ganado interés debido a su aparente papel a la hora de promover la longevidad, un fenómeno relacionado con la restricción calórica (Bellizzi et al., 2005, Vaquero and Reinberg, 2009). Aunque muchos estudios defendían que la función de SIRT3 era exclusivamente mitocondrial (Onyango et al., 2002, Schwer et al., 2002), SIRT3 también se localiza y actúa en el núcleo (Scher et al., 2007, Nakamura et al., 2008, Sundaresan et al., 2008).

La sobreexpresión de SIRT3 protege a la células frente a la apoptosis mediada por BAX, actuando sobre genes diana de NF- κ B tales como MnSOD y BCL2, creando así una resistencia celular al daño mediado por peróxido de hidrógeno (Chen et al., 2013).

SIRT3 tiene un papel clave en el metabolismo mitocondrial. Es el principal regulador de los niveles de acetilación de proteínas en la mitocondria y por lo tanto de su actividad biológica. Actúa como un sensor metabólico que responde a cambios en el estado energético de la célula y modula la actividad de enzimas claves en el metabolismo mediante la desacetilación de proteínas (Hirschey et al., 2011). De este modo regula el metabolismo de carbohidratos, la cetogénesis (Shimazu et al., 2010), β -oxidación (Hirschey et al., 2010), y el metabolismo de amino ácidos (Lombard et al., 2007).

También se ha identificado a SIRT3 como supresor tumoral (Kim et al., 2010), ya que colabora en la disminución de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen como consecuencia de una elevada oxidación de ácidos grasos. SIRT3 promueve la actividad antioxidante de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) (Chen et al., 2011, Qiu et al., 2010) y lo que es más, la ausencia de SIRT3 se correlaciona con un aumento de la glicolisis, característico de la proliferación de células tumorales.

6.2. SIRT3 en el daño renal

SIRT3 se expresa en el riñón y en otros tejidos metabólicamente activos y desempeña un papel importante en la resistencia al estrés celular. En ratones deficientes para el receptor tipo I de la angiotensina II, una elevada expresión renal de SIRT3 reduce ROS y mejora la dinámica mitocondrial lo que se traduce en una mayor longevidad (Benigni et al., 2009). SIRT3 tiene efectos antioxidantes y antiinflamatorios protegiendo a las células tubulares renales frente a la lipotoxicidad inducida por palmitato (Kitada et al., 2014). Además, SIRT3 es protector frente al FRA. En el FRA inducido por cisplatino, las células tubulares presentan mitocondrias anormales y una expresión disminuida de SIRT3 renal tanto a nivel de ARNm como de proteína. (Morigi et al., 2015, Ugur et al., 2015).

6.3. SIRT3 como enzima decrotonilasa

Recientemente se ha descrito que SIRT3 tiene también función decrotonilasa (Bao et al., 2014). Encontrar las enzimas que llevan a cabo la modificación de histonas es complicado porque las interacciones entre estas enzimas y las histonas son débiles y breves. Recientemente, Bao X. et al utilizaron el abordaje transcriptómico CLASPI (*cross-linking-assisted and stable isotope labeling in cell culture-based protein identification*) para estudiar las interacciones entre proteínas mediadas por la crotonilación. Así comprobaron que tres de las siete sirtuínas se unen a las histonas crotoniladas. Estas tres enzimas (SIRT1, SIRT2 y SIRT3) son capaces de eliminar grupos crotonilo de las histonas en experimentos llevados a cabo en tubo de ensayo, pero solo SIRT3 consigue hacer esto mismo en células vivas. Esto está mediado por un mecanismo similar al de eliminación de grupos acetilo, por el cual SIRT3 reconoce el grupo crotonilo de las histonas mediante una única interacción entre el grupo crotonilo y un aminoácido específico en el hueco de unión de SIRT3. Además, SIRT3 regula la dinámica de crotonilación de histonas en células vivas ya que en células deficientes para SIRT3 aumentan los niveles de crotonilación de histonas (Bao et al., 2014).

7. SIRT3 y PGC-1 α

Bajo condiciones fisiológicas y de estrés, SIRT3 y PGC-1 α se regulan mutuamente el uno al otro (Shi et al., 2005, Palacios et al., 2009, Than et al., 2011, Giralt et al., 2011). SIRT3 promueve la actividad del eje AMPK-PGC-1 α . Diferentes estudios revelan que SIRT3 modula la fosforilación y actividad de AMPK. Las células o tejido muscular con una función de SIRT3 reducida mostraban una menor fosforilación de AMPK y niveles más bajos de PGC-1 α (Pillai et al., 2010, Palacios et al., 2009, Shi et al., 2005). Esto está asociado también con una menor fosforilación y actividad de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta AMPc), un factor de transcripción que promueve la expresión de PGC-1 α (López-Lluch et al., 2008). Por otra parte, SIRT3 es un gen diana de PGC-1 α y mediador de los efectos de PGC-1 α en la

biogénesis mitocondrial. De este modo, estas dos proteínas forman un lazo de retroalimentación positiva bajo condiciones fisiológicas y de estrés (Kong et al., 2010).

Otros estudios defienden que también es posible que SIRT3 mitocondrial actúe directamente sobre PGC-1 α , sugiriendo la existencia de una fracción mitocondrial de PGC-1 α asociada a un complejo que contiene ADN mitocondrial (Aquilano et al., 2010, Choi et al., 2013). De esta manera, análogamente a la función de SIRT1 en la desacetilación y activación nuclear de PGC-1 α (Nemoto et al., 2005, Rodgers et al., 2005), SIRT3 desacetilaría a PGC-1 α mitocondrial afectando su actividad. No obstante, hay muy poca información funcional al respecto de PGC-1 α mitocondrial.

En base a estos antecedentes, en esta tesis nos hemos propuesto abordar los mecanismos moleculares de la lesión renal y tubular inducida por TWEAK y sus implicaciones terapéuticas. En concreto abordamos la modulación por TWEAK de la expresión de PGC-1 α y de la crotonilación de histonas.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

El tratamiento actual de la enfermedad renal, tanto aguda como crónica, no es satisfactorio. El estudio de sus mecanismos patogénicos puede permitir el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos. En este sentido, hipotetizamos que el estudio detallado de los mecanismos moleculares reclutados por TWEAK, una citoquina que contribuye al daño renal, puede ayudar a diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

Objetivo general:

El objetivo general del presente trabajo será identificar y caracterizar nuevos objetivos terapéuticos y marcadores de lesión y progresión en el fracaso renal agudo, activados por la citoquina TWEAK.

Objetivos específicos:

1. Estudiar la regulación y el impacto de una nueva modificación postraducciona de histonas, la crotonilación, en la enfermedad renal.
2. Estudiar el impacto de mediadores de la inflamación, tomando como ejemplo TWEAK, sobre genes reguladores de la biogénesis mitocondrial

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos experimentales

Los estudios en animales fueron realizados acorde a la normativa nacional vigente (Directiva 2010/63/EU, Recomendación 2007/526/EC y Real Decreto 53/2013) y aprobados por el comité éticos de las institución en la que se realizaron (Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz e Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols). Los modelos se realizaron en ratones hembra de la cepa C57BL/6 (Charles River) de entre 12-14 semanas de edad, y con un peso comprendido entre 19-24 g.

1.1. Modelo experimental de fracaso renal agudo (FRA)

La nefropatía inducida por ácido fólico es un modelo clásico de FRA con daño tubulointersticial e inflamación (Sanz et al., 2008a, Doi et al., 2006), que se ha descrito también en humanos (Metz-Kurschel et al., 1990). Para este modelo de FRA, los ratones recibieron una única inyección intraperitoneal con 250 mg/kg de ácido fólico (Sigma) o vehículo (bicarbonato sódico 0,3 mol/l) para los animales control. Los animales fueron sacrificados 6, 24 y 72 horas o 7 días tras la inyección (n=5 por grupo) (**Figura 4**).

Se realizó otro modelo de FRA inducido por cisplatino en ratones hembra de 12 semanas de edad que recibieron una única inyección intraperitoneal con 20 mg/kg de cisplatino (Sigma) o vehículo (salino) para los animales control (Zhang et al., 2008). El tiempo elegido para el sacrificio fue 72 horas (n=5 por grupo), momento del máximo daño.

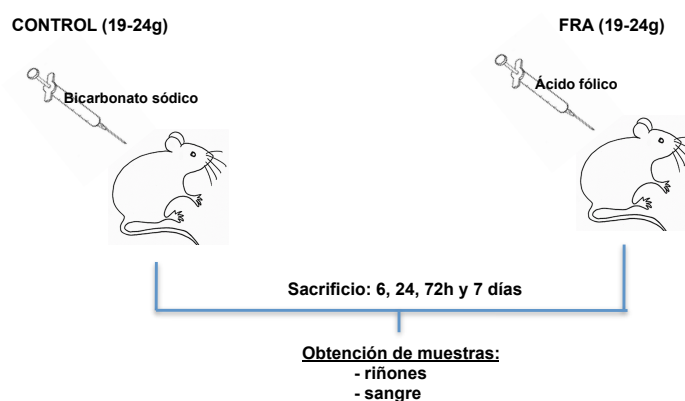


Figura 4. Esquema del modelo experimental de FRA por inyección de ácido fólico.

1.2. Modelo experimental con TWEAK y anti-TWEAK

Otro grupo de ratones recibió una inyección intraperitoneal con 25 µg/kg de la citoquina TWEAK (Alexis, EnzoLifesciences) o vehículo (salino) para los controles. Los ratones fueron sacrificados 48 o 72 horas tras la inyección (n=5 por grupo). La dosis de TWEAK fue calculada basándonos en experimentos *in vitro* para un volumen extracelular de 6,5 ml/ratón. Además, previamente ya se había comprobado que esa dosis de TWEAK induce respuestas biológicas en

los riñones (Sanz et al., 2008a). La inyección de TWEAK se repitió cada 24h hasta el día del sacrificio.

Por otro lado, otro grupo de ratones se trató con dosis de 200 µg de anticuerpo anti-TWEAK neutralizante (clon P2D10, Biogen Idec) o la IgG isotipo control (Moreno et al., 2011, Izquierdo et al., 2012) (n=5-6 por grupo). Los animales recibieron el anti-TWEAK 1 día antes y 2 días después de la inyección de ácido fólico y fueron sacrificados 24 y 72 horas tras la inyección de ácido fólico.

1.3. Modelo experimental de crotonato y FRA

Para estudiar el efecto del crotonato en el FRA, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con crotonato. Para los experimentos dosis-respuesta los ratones recibieron dosis de 3, 6 y 12 mmol/kg de crotonato (Sigma) o vehículo (salino), y fueron sacrificados 48 horas después. Para los experimentos de curva de tiempo los ratones recibieron una inyección con una dosis de crotonato de 12 mmol/kg o vehículo (salino), y fueron sacrificados a las 24, 48 y 72 horas (n=4 para cada grupo: dosis y tiempo). La dosis de crotonato fue calculada basándose en experimentos *in vitro* para un volumen extracelular de 6,5 ml/ratón y posteriormente refinada con los estudios de dosis-respuesta. Una vez elegida la dosis y tiempo más adecuados, otro grupo de animales fueron pre-tratados con 12 mmol/kg de crotonato 24 horas antes de inducir un FRA mediante inyección intraperitoneal de 250 mg/kg de ácido fólico. Los ratones se sacrificaron a las 72 horas tras la inyección de ácido fólico, momento del máximo daño renal. La inyección de crotonato se repitió cada 24h hasta el día del sacrificio.

En todos los modelos animales los riñones fueron perfundidos *in situ* con salino frío antes de la extracción de los mismos. Uno de los riñones se trocó y congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para posteriores estudios de ARN, proteína e histonas. La mitad del otro riñón se fijó en paraformaldehído (PFA) 4% y posteriormente se incluyó en parafina para realizar estudios inmunohistoquímicos. La mitad sobrante se incluyó en medio de crioconservación Tissue-Teck® OCT Compound (Sakura). La sangre se recogió de la vena femoral antes de perfundir los riñones.

Análisis bioquímicos

Las concentraciones séricas de creatinina y nitrógeno ureico (BUN) se midieron en el Servicio de Bioquímica del Hospital Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

2. Experimentos in vitro

2.1. Células en cultivo y reactivos

Para los experimentos in vitro se utilizó una línea de células epiteliales de túbulo proximal procedentes de riñón murino (MCTs). Estas células son originarias de riñones de ratones SJL de la universidad de Pensilvania y nos fueron cedidas por el profesor Eric G Neilson (Haverty et al., 1988).

Las células fueron sembradas a una concentración de $0,5-1 \times 10^6$ células/ml en placas (Cultek) y cultivadas en medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 10% (vol/vol) suero fetal bovino (SFB) (Sigma) previamente deplementado (30 minutos a 56°C), 2 mM de L-Glutamina (Sigma) y los antibióticos penicilina y estreptomicina (100 U/ml de cada uno) (Sigma), a 37°C de temperatura y atmósfera al 5 % de CO₂.

Todos los experimentos in vitro se realizaron con células al 80% de confluencia y privadas de SFB durante 24 h.

Las células fueron estimuladas con la citoquina recombinante soluble TWEAK (Millipore) a la concentración de 100 ng/ml, basándonos en experimentos previos de dosis-respuesta realizados el mismo tipo celular (Sanz et al., 2008b).

Por otro lado se estimuló con crotonato (Sigma) a la concentración de 50 mM y 100 mM, basándonos en estudios previos sobre la dinámica de la crotonilación de histonas en respuesta a crotonato (Tan et al., 2011). El crotonato se preparó a partir de ácido crotonico (Sigma). Se preparó un *stock* de concentración 1M mediante dilución en H₂O y posteriormente se ajustó el pH a 7,5. A partir de este stock se hicieron las diluciones correspondientes directamente en medio de cultivo.

También se estimuló con cisplatino (Sigma) a las concentraciones 50 μ M y 100 μ M, y con manitol (Sigma) a las mismas concentraciones de 50 y 100 mM.

Los inhibidores de histona deacetilasas (HDAC) utilizados fueron tricostatina A (Millipore) y ácido valproico (Sigma), y se usaron a las concentraciones de 1,5 ng/ml y 500 μ M respectivamente. Estas dosis fueron elegidas basándonos en experimentos *in vitro* dosis-respuesta.

El inhibidor de NF κ B utilizado fue parthenolide (Sigma) a una concentración de 10 μ M, basándonos también en estudios previos dosis-respuesta en este sistema (Sanz et al., 2008a).

2.2. Infección con adenovirus (Ad)

Para los experimentos con adenovirus recombinantes, las células MCT fueron infectadas con adenovirus control GFP (Ad-GFP) (título= 1×10^{10} PFU/ml) o con adenovirus codificantes para PGC-1 α murino (Ad-PGC-1 α) (título= 1×10^{10} PFU/ml), 48 horas antes del

experimento. Infectamos con aproximadamente 10 PFU por célula. La eficiencia de la infección fue confirmada mediante la visualización de GFP con microscopio de fluorescencia.

Las construcciones adenovirales se llevaron a cabo en el Departamento de Metabolismo y Señalización Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas Albero Sols y fueron cedidas por la doctora María Monsalve.

3. Análisis genético.

3.1. Transcripción inversa y PCR a tiempo real

La obtención del ARN total del tejido de riñón congelado en nitrógeno líquido se llevó a cabo mediante su pulverización en un troquel y un lisado tisular posterior con TRI Reagent® (Invitrogen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Del mismo modo las células se homogenizaron en TRI Reagent® (Invitrogen) y se continuó con el protocolo de extracción de ARN recomendado por el fabricante.

El ARN obtenido se cuantificó por medida de la absorbancia de las muestras a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/ml de ARN. Se comprobó que la relación entre las absorbancias 260 y 280 nm era cercana a 2, lo que indica que el ARN procesado es puro y no está contaminado por proteínas. La transcripción inversa se realizó con 1 µg de ARN total utilizando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Life Technologies).

Los niveles de ADNc de los genes a estudio fueron determinados utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real mediante el sistema de detección de secuencias Real-Time FAST PCR 7500 (Life Technologies) con el software Prism 7000 System SDS (Applied Biosystems). Se realizó un estudio multiplex empleando sondas de hibridación para cada gen a estudiar, y como control para normalizar los datos se utilizó una sonda para el gen GAPDH (**Tabla 2**). El número de ciclos y las temperaturas utilizadas fueron las siguientes: un primer paso con 1 ciclo de 2 minutos a 50°C, un segundo paso de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C y un tercer paso de 40 ciclos compuestos cada uno por una etapa de 15 segundos a 95°C seguida de otra etapa de 60 segundos a 60°C, siendo en esta última etapa de cada ciclo en la que se recogieron las medidas. Todas las sondas fueron adquiridas en Applied Biosystems. Todas las medidas fueron realizadas por duplicado, utilizando H₂Odd como control negativo. El número de copias de ARNm se calculó usando el programa incluido en el instrumental a partir del valor Ct (ciclo umbral) mediante el método de cuantificación $2^{-\Delta CT}$. Los resultados se normalizaron con sus correspondientes valores de GAPDH. Los resultados de los análisis de niveles de ARNm se expresaron como porcentaje del incremento respecto al control correspondiente y se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM).

| Gen | Fluoróforo/especie | Número identificador |
|------------------|--------------------|----------------------|
| CCL2 | FAM/ratón | Mm00441242_m1 |
| PCG-1 α | FAM/ratón | Mm01208835_m1 |
| Sirt3 | FAM/ratón | Mm00452131_m1 |
| Fn14 (Tnfrsf12a) | FAM/ratón | Mm00489103_m1 |
| TWEAK (Tnfsf12a) | FAM/ratón | Mm00839900_m1 |
| Kim-1(Havcr1) | FAM/ratón | Mm00506686_m1 |
| Ndufs1 | FAM/ratón | Mm00523640_m1 |
| Sdha | FAM/ratón | Mm01352366_m1 |
| Tfam | FAM/ratón | Mm00447485_m1 |
| GADPH | VIC/ratón | Mm99999915_m1 |

Tabla 2. Listado de las sondas utilizadas para el análisis génico por PCR a tiempo real

3.2. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Para realizar los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se usaron 1×10^6 células por muestra. Las células se fijaron con formaldehído 35% y posteriormente fueron lisadas en buffer de lisis (5 mM HEPES, 85 mM KCl, 0,5% NP40, pH 8,0 y cocktail inhibidor de proteasas). Tras esto el pellet se resuspendió en el buffer de lisis de núcleos (50 mM Tris.HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, pH 8,1) y se sonicó con el sonicador Diagenode. Para la inmunoprecipitación de la cromatina se usaron anti-conejo IgG *Dynabeads* (Life Technologies). La cromatina fue diluida en buffer de unión (10% Triton-X, 10% desoxicolato de sodio, Tris-EDTA y cocktail inhibidor de proteasas) e inmunoprecipitada usando anti-conejo IgG *Dynabeads* con 3 μ g de anticuerpo anti-acetyl-Histona H3 (Lys9) (Merck Millipore) o del anticuerpo anti-NF κ B p65 (Rel A) (Merck Millipore). Posteriormente, los complejos cromatina-anticuerpo se lavaron y fueron eluidos de las *beads* usando el buffer de elución (1 M Tris (pH 8,0), 0,5 M EDTA, 10% SDS y H₂Odd). Tras el *reverse crosslink* y el tratamiento con proteinasa K, se extrajo el ADN con el método fenol-cloroformo. 1 μ l del ADN inmunoprecipitado y eluido fue analizado por PCR a tiempo real. Los primers fueron diseñados para amplificar NF κ B (regiones de la 1 a la 4) en el promotor del gen PGC-1 α . Estas regiones fueron identificadas por ALGGEN-PROMO (http://alggen.lsi.upc.es/cgibin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3). Alicuotas de la cromatina obtenida antes de la inmunoprecipitación fueron analizados como control *input*. Los primers para cada región se indican en la **Tabla 3**. Los resultados se presentaron como número

de veces de enriquecimiento del ADN precipitado asociado a la unión con una modificación de histonas dada (acetilación-AcH3) o con RelA (subunidad p65 de NFκB), relativo a una dilución 1/100 de la cromatina *input*.

| NOMBRE | SECUENCIA |
|-----------|---------------------------|
| Región 1s | TCAGCCCTTGTAATGTGTGG |
| Región 1a | CTCTCTCTCTCTCTCTGTGTGTGTG |
| Región 2s | TGTTTTCTTCTAAGGGGAGAG |
| Región 2a | TCAAACCCACAGACTCAA |
| Región 3s | TTGAGTCTGTGGGGTTTGA |
| Región 3a | GGTGCCACTGTTTTCTGT |
| Región 4s | TGGGAGCCTATGAGATCCAC |
| Región 4a | AACCGCCACATTTGTTTAGG |

Tabla 3. Primers para el ChIP (inmunoprecipitación de cromatina) RT-PCR a tiempo real del promotor del gen PGC-1α.

Para la amplificación del ADN copia usamos la mezcla SYBR* Premix Ex Taq™ (Takara Biotechnology) según las instrucciones del fabricante y siguiendo un programa de tres pasos: un primer paso de 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, un segundo paso de 40 ciclos compuestos cada uno por una etapa de 20 segundos a 95°C, otra etapa de 20 segundos a 62°C, seguida de una tercera etapa de 30 segundos a 72°C; siendo en esta última etapa de cada ciclo en la que se recogieron las medidas. Más un paso extra de disociación de cebadores (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C y 15 segundos más a 60°C). Todas las medidas se hicieron por triplicado utilizando H₂O_{dd} como control negativo.

3.3. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina-secuenciación (ChIP-seq)

La técnica de ChIP-seq combina la inmunoprecipitación de cromatina con secuenciación en paralelo a gran escala. Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio del profesor Bing Ren, con la ayuda y supervisión de su equipo, en el Ludwig Institute for Cancer Research & UCSD School of Medicine, en San Diego, California.

El ChIP-seq para crotonilación de histonas se realizó con tejido renal de ratón obtenido 24 horas después de una inyección intraperitoneal de ácido fólico o de vehículo (bicarbonato sódico) para el grupo control, con una n=6 para cada grupo; y con células MCT expuestas durante 6 horas a 100 ng/ml de TWEAK o vehículo, con una n=3 experimentos independientes.

La inmunoprecipitación de cromatina se llevó a cabo con 100 µg de cromatina de células o tejido fraccionado y con 5 µg del anticuerpo anti-crotonyl-lysine (PTM Biolabs) siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para el ensayo de ChIP. Las librerías de secuenciación fueron preparadas siguiendo los protocolos de Illumina (Illumina). La librería de las muestras *input* fue generada usando 20 ng de cromatina del *input* correspondiente. Primero, se redondearon los extremos del ADN ChIPed con el kit END-IT reparador de ADN (Epicenter Biotechnology), y luego se incubaron con los fragmentos Klenow (3'→5' exo-) (New England Biolabs) y dATP para generar un extremo voladizo 3' con una sola base (3'-dA). Tras esto se unieron al ADN los adaptadores de secuenciación de Illumina, y se seleccionó el tamaño deseado (180-400 pb) en un gel de acrilamida al 8%. Las librerías fueron secuenciadas usando la máquina Illumina GAII o HiSeq, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los datos de secuenciación fueron analizados por el servicio de bioinformática del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC, Madrid-España).

4. Array transcriptómico

El array transcriptómico se realizó con tejido renal de ratón obtenido 24 horas después de una inyección intraperitoneal de ácido fólico (Sigma) o de vehículo (bicarbonato sódico preparado en H₂O), con una n=3 para cada grupo; y con células MCTs expuestas durante 6 horas a 100 ng/ml de TWEAK o vehículo, con una n=3 experimentos independientes. Estos experimentos se llevaron a cabo en la Unidad Genómica Moncloa, Fundación Parque Científico de Madrid, Madrid-España. Posteriormente los datos fueron analizados. Los archivos de imagen se obtuvieron inicialmente a través de Affymetrix GeneChip® Command Console® Software (AGCC), seguido del Robust Multichip Analysis (RMA) llevado a cabo con Affymetrix Expression Console® Software. Empezando con el RMA normalizado, el análisis de significancia se realizó usando el paquete limma (Babelomics, www.babelomics.org), usando una razón de falsos descubrimientos (FDR) del 5% para identificar genes que están diferencialmente regulados entre los grupos analizados.

5. Análisis proteico

5.1.- Extracción de proteínas

Las proteínas se extrajeron de tejido de riñón congelado en nitrógeno líquido. La muestra se pulverizó en un troquel y se recogió el pulverizado obtenido en un tampón de lisis compuesto por: Tris-HCl (50 mM), NaCl (150 mM), EDTA (2 mM); EGTA (2 mM); Triton X-100 (0,2%); NP-40 (0,3%); PMSF (1 mM), coctel de inhibidores de proteasas (1 µl/ml), NaF (25 mM); Na₃VO₄ (100 µM) y DTT (1 mM). Todos los reactivos utilizados en este punto se adquirieron en Sigma.

La obtención de proteínas a partir de células en cultivo se realizó levantando y recogiendo las células en el mismo tampón de lisis utilizado para los riñones. En ambos casos, tejido renal y células en cultivo, se realizaron varios ciclos de agitación durante 15 segundos seguidos de 20 minutos de reposo en hielo. Finalmente se centrifugaron los tubos a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio para su crioconservación. La concentración de proteínas en las muestras se determinó mediante el método del BCA.

5.2. Extracción de histonas

La obtención de histonas se hizo a partir de tejido de riñón y de células en cultivo empleando el kit comercial EpiQuik Total histone Extraction kit (Epigentek), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de histonas en las muestras se determinó por BCA.

5.3. Western Blot

Las proteínas extraídas fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida (10-15 %) en condiciones reductoras. Una vez separadas en el gel, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón TBSt (1 mM Tris (pH 7,5), 10 mM NaCl y 0,1% Tween-20) conteniendo 5% de leche desnatada o 5% de BSA (albúmina de suero bovino) según recomendación del fabricante del anticuerpo, para evitar uniones inespecíficas. A continuación se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios (**Tabla 4**) durante toda la noche a 4°C. Tras sucesivos lavados en TBSt, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP (GeHealthcare) durante 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo se realizaron varios lavados para retirar el exceso de anticuerpo no unido. Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia ECL (Millipore). Los anticuerpos anti- α -tubulina y anti-histonas H3 (**Tabla 4**) se emplearon como control de carga de proteínas totales y de histonas respectivamente. Los resultados de los análisis de niveles de proteína se expresaron como porcentaje del incremento respecto al control correspondiente y están expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM).

| Anticuerpo primario | Casa comercial | Dilución | Anticuerpo secundario | Dilución |
|---------------------|----------------|----------|-----------------------|----------|
| Kcr | PTM Biolabs | 1/1000 | IgG conejo HRP | 1/2000 |
| PGC-1 α | CalbioChem | 1/1000 | IgG ratón HRP | 1/2000 |
| SIRT3 | Cell Signaling | 1/1000 | IgG conejo HRP | 1/2000 |
| H3k9cr | PTM Biolabs | 1/1000 | IgG conejo HRP | 1/2000 |

| | | | | |
|--------------------|--------------------|---------|----------------|--------|
| Fn14 | Cell Signaling | 1/1000 | IgG conejo HRP | 1/2000 |
| TWEAK | Novus Laboratories | 1/1000 | IgG conejo HRP | 1/2000 |
| H3 | Cell Signaling | 1/2000 | IgG conejo HRP | 1/2000 |
| α -tubulina | Sigma | 1/10000 | IgG ratón HRP | 1/2000 |

Tabla 4. Anticuerpos y concentraciones para detectar niveles de proteína por Western blot.

6. Inmunohistoquímica tisular

Las tinciones inmunohistoquímicas (IHQ) se realizaron para detectar la presencia, niveles y localización de diferentes proteínas en el tejido renal.

El tejido de riñón incluido en parafina se cortó en secciones de 3 μ m de grosor, usando un micrótopo, y se montaron en portaobjetos de carga positiva (Dako). Los cortes se desparafinaron durante 1 hora a 60°C y posteriormente se hizo la recuperación antigénica en solución de citrato utilizando el sistema PT-link de Dako (pH6, a 95°C durante 20 minutos).

6.1. Estudio de la presencia, niveles y localización de Crotonilación

Tras desparafinar y realizar la recuperación antigénica, las muestras fueron lavadas durante 5 minutos y bloqueadas en PBS con 5% de leche durante 30 minutos. Tras esto se incubaron las secciones con el anticuerpo anti-crotonyl-lysine (PTM Biolabs) diluido 1/250 en TBS 0,5% leche durante 2 horas. Se lavó 3 veces con TBS y se incubó con el anticuerpo secundario biotilado (Amersham) dilución 1/200 en PBS 0,5% leche durante 30 minutos, seguido del complejo avidina-biotina (ABCComplex, Dako) durante otros 30 minutos. Posteriormente se reveló con 0,05% DAB (Dako). Las secciones se contrastaron con hematoxilina (Dako), se deshidrataron y se montaron con resina acrílica con base de xileno (DPX, Sigma). Para descartar tinción inespecífica se realizó un control negativo omitiendo el anticuerpo primario.

Esta inmunohistoquímica se realizó también en 5 muestras de riñón humano del Biobanco del IIS-FJS, correspondientes a varones de edades comprendidas entre los 56 y 80 años, con niveles de creatinina sérica entre 0,7 y 1,7 mg/dl.

7. Inmunofluorescencia tisular y celular

7.1. Estudio de la localización celular de la Crotonilación

Para la inmunofluorescencia un millón de células fueron sembradas en placas de cultivo de 12 pocillos (Cultek) donde previamente se habían colocado lentejas de cristal en el fondo de cada pocillo. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con buffer neutro de formalina 10% (Sigma) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados

breves con PBS, las células se permeabilizaron con PBS/ Triton-X-100 2% durante 10 minutos en hielo. Las células permeabilizadas se lavaron con PBS y se bloquearon con PBS/BSA 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual fueron incubadas con el anticuerpo anti-crotonyl-lysine (PTM Biolabs) diluido 1/500 en PBS/BSA 5% a 4°C durante toda la noche. Seguidamente se incubó con una IgG anti-conejo AlexaFluor488-cabra (dilución 1/300 en PBS/BSA 5%, Invitrogen) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente las células fueron incubadas con faloidina AlexaFluor 555 (Life technologies) dilución 1/1500 en PBS/BSA 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente, contrastadas con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) y se montó en Mowiol (Sigma).

7.2. Estudio de la localización de TWEAK y Fn14 en el tejido renal

Las tinciones de inmunofluorencencia se realizaron para detectar la presencia y localización de diferentes proteínas en el tejido renal.

El tejido de riñón incluido en parafina se cortó en secciones de 3 µm de grosor, usando un micrótopo, y se montaron en portaobjetos de carga positiva (Dako). Los cortes se desparafinaron durante 1 hora a 60°C y posteriormente se hizo la recuperación antigénica en solución de citrato utilizando el sistema PT-link de Dako (a 95°C durante 20 minutos) y ajustando el pH a las indicaciones especificadas por el fabricante para cada anticuerpo: TWEAK (R&D) pH 6 y Fn14 (Cell Signaling) pH 9.

Las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se bloquearon utilizando una solución de PBS/BSA 4% + 6% de suero. Tras esto, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios (TWEAK (R&D) dilución 1/10 y Fn14 (Cell Signaling) dilución 1/20) a 4°C durante toda la noche, y seguidamente se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (conjugados con fluorocromos, Alexa Fluor) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, el tejido se incubó con la lectina Lotus tetragonolobus conjugada con fluoresceína (Vector Labs) para marcar túbulos proximales y con las lectina Dolichos biflorus (Sigma) para marcar los túbulos distales (dilución 1/30 en PBS/BSA 4%) durante 30 minutos a temperatura ambiente y fue contrastado con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) y montado en Mowiol (Sigma). Los controles negativos se llevaron a cabo incubando las muestras con la IgG isotipo.

8. Citometría de flujo

Las células fueron sembradas a una concentración de 1×10^4 en placas de 12 pocillos (Cultek) en medio RPMI-1640 con 10% de SFB. Las células fueron deplecionadas de SFB 24 horas antes de estimularlas con crotonato, y el estímulo se añadió a células al 80% de confluencia.

8.1. Caracterización de células apoptóticas

Para la valoración de apoptosis, el pool de células (pegadas + levantadas) fue incubado con 100 µg/ml de ioduro de propidio (PI), 10 µg/ml RNasa A y 0,05% de NP-40 en PBS a 4°C durante un tiempo como mínimo de 1 hora. De este modo se permeabilizan las células y el PI tiñe el ADN nuclear tanto de células vivas como de muertas (apoptóticas). Las células apoptóticas tendrán una menor intensidad de tinción ya que su carga de ADN se ha reducido, son células hipodiploides. Tras esto, el porcentaje de células apoptóticas se cuantificó midiendo el pico de ADN hipodiploide por citometría de flujo usando el software BD CellQuest (BD Biosciences), y se expresó como % de células apoptóticas respecto al control correspondiente.

8.2. Estudios del potencial de membrana mitocondrial (MMP) mediante TMRM

Para evaluar la función mitocondrial se determinó el potencial de membrana mitocondrial (MMP) por citometría de flujo usando la sonda tetrametil rodamina metil éster (TMRM) (Life Technologies). El pool de células (pegadas + levantadas) fue teñido con 150 nM de TMRM durante 10 minutos a 37°C. La intensidad de fluorescencia fue medida por citometría de flujo usando el software BD FACS Diva (BD Biosciences). Los cambios en MMP se determinaron como diferencias en fluorescencia de TMRM. La disminución de fluorescencia TMRM indica una reducción del potencial de membrana mitocondrial. Los resultados se expresaron como % de células con tinción TMRM positiva (TMRM⁺) respecto al control correspondiente.

9. Estadística

Todas las valoraciones se determinaron por duplicado o triplicado. Los datos se expresan como media ± error estándar de la media (EEM) del número total de experimentos (estudios *in vitro*) o de animales (estudios *in vivo*). El análisis estadístico de todos los resultados se realizó utilizando el software estadístico SPSS versión 11.0. Primero se comprobó que las muestras siguieran una distribución normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov), y en los casos en que este supuesto se cumplió, se realizó un análisis comparativo de las medias utilizando el test paramétrico t de Student. En los casos en los que las muestras no eran normales, se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para dos grupos y el análisis de varianza para tres o más grupos. La correlación Pearson fue usada para estudiar la correlación entre dos variables continuas. En cualquiera de los casos las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

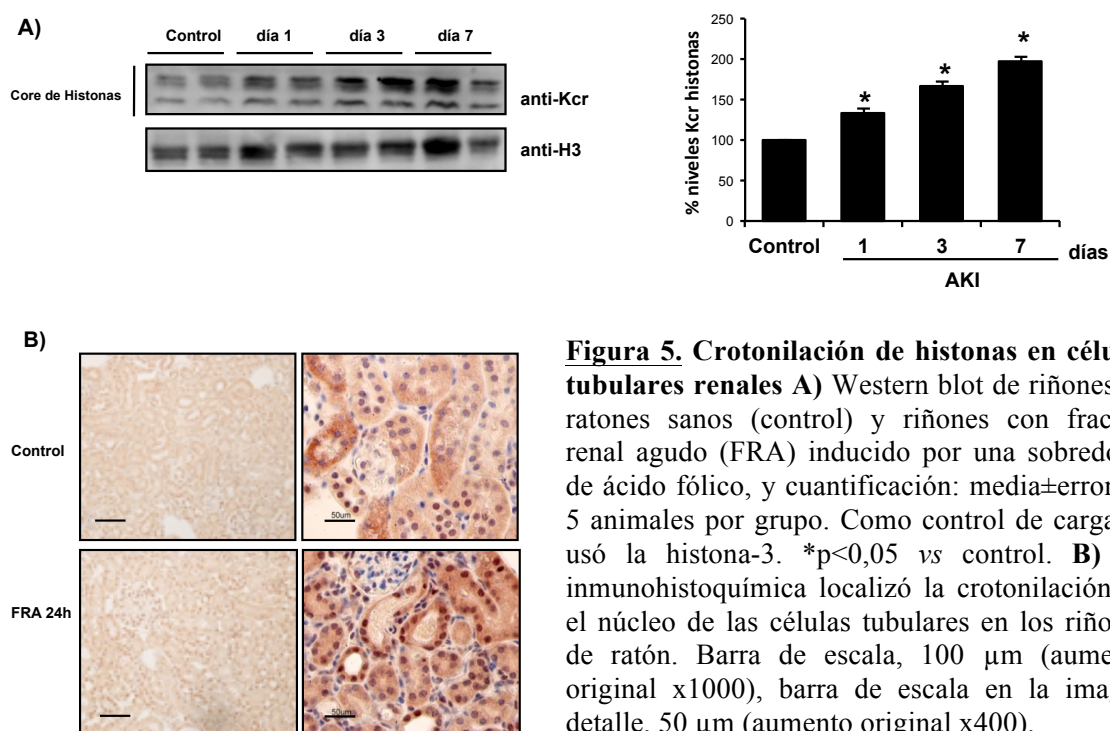
IV. RESULTADOS

1. La crotonilación de histonas está aumentada en células tubulares renales murinas durante el fracaso renal agudo

Estudios recientes identificaron la crotonilación de histonas (Kcr) como una nueva modificación postraducciona de histonas conservada evolutivamente y presente en varios tejidos somáticos de ratones adultos, siendo el riñón uno de los tejidos con mayores niveles de crotonilación (Tan et al., 2011). Esto sugiere que la crotonilación de histonas podría estar implicada en la regulación epigenética de la expresión de genes durante el daño renal.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, primero evaluamos el patrón de crotonilación de histonas en un modelo murino de FRA inducido por ácido fólico, y los resultados se confirmaron en otro modelo experimental de FRA inducido por cisplatino. En el FRA inducido por ácido fólico, al igual que en otros modelos experimentales y en el FRA humano, se produce pérdida de función renal, daño de las células tubulares e inflamación intersticial (Sanz et al., 2008).

La crotonilación de histonas se observó en tejido renal de ratones sanos mediante estudios de Western blot (**Figura 5.A**) e inmunohistoquímica (**Figura 5.B**), tal y como se había descrito anteriormente (Tan et al., 2011). Mediante Western blot se identificaron las histonas como proteínas crotoniladas, mientras que la inmunohistoquímica localizó la crotonilación principalmente en el núcleo de las células tubulares (**Figura 5.B**). El Western blot reveló un aumento general de la crotonilación de histonas en el tejido renal durante el FRA (**Figura 5.A**).



Resultados similares se observaron en un modelo de FRA inducido por cisplatino a 72h (**Figura 6**). Sin embargo, el resto de resultados estudiados y discutidos en este trabajo se obtuvieron en el modelo de ácido fólico.

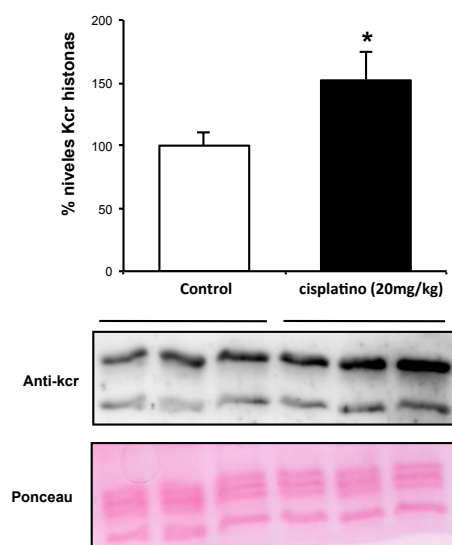


Figura 6. La crotonilación de histonas aumenta *in vivo* en el FRA inducido por cisplatino. Western blot de riñones de ratones sanos (control) y riñones con fracaso renal agudo (FRA) inducido por cisplatino, y cuantificación: media±error de 5 animales por grupo. Como control de carga se usó el Ponceau. *p<0,05 vs control

También se estudió el patrón de crotonilación de la histona H3 (H3k9cr) durante el daño renal. Al igual que lo observado con la crotonilación de histonas totales, la crotonilación de H3 aumentó en el tejido renal del modelo de FRA inducido por ácido fólico (**Figura 7**).

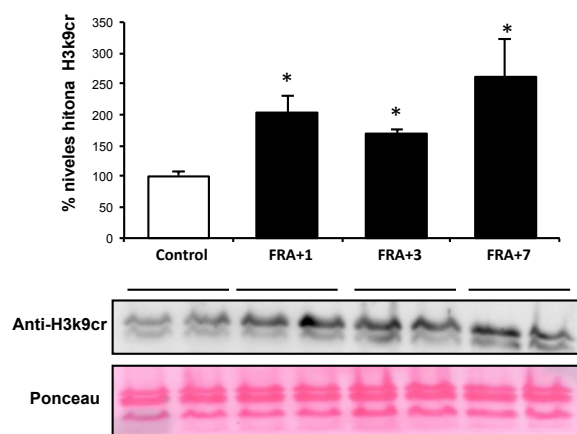


Figura 7. Niveles de crotonilación de la lisina-9 de la histona H3 *in vivo*. Western blot de riñones de ratones sanos (control) y riñones con fracaso renal agudo (FRA) inducido por ácido fólico, y cuantificación: media±error de 5 animales por grupo. Como control de carga se usó el Ponceau. *p<0,05 vs control

La localización nuclear de la crotonilación, consistente con la crotonilación de histonas, también se observó en células murinas de túbulo proximal en cultivo mediante inmunofluorescencia (**Figura 8.A**). Al igual que *in vivo*, se observaron diferentes grados de crotonilación en las células tubulares cultivadas, lo que sugiere que la crotonilación es un proceso regulado y dinámico. La separación de núcleo y citosol celular reveló una banda apenas visible de proteínas crotoniladas en el citosol y una intensa banda en el núcleo correspondiente con el tamaño de las histonas (**Figura 8.B**). De este modo, se confirma que las histonas son las

proteínas más crotoniladas en células tubulares. En una aproximación inicial a la investigación traslacional de la crotonilación, se comprobó mediante inmunohistoquímica la presencia de crotonilación de lisinas en células tubulares de riñón humano enfermo (**Figura 8.C**).

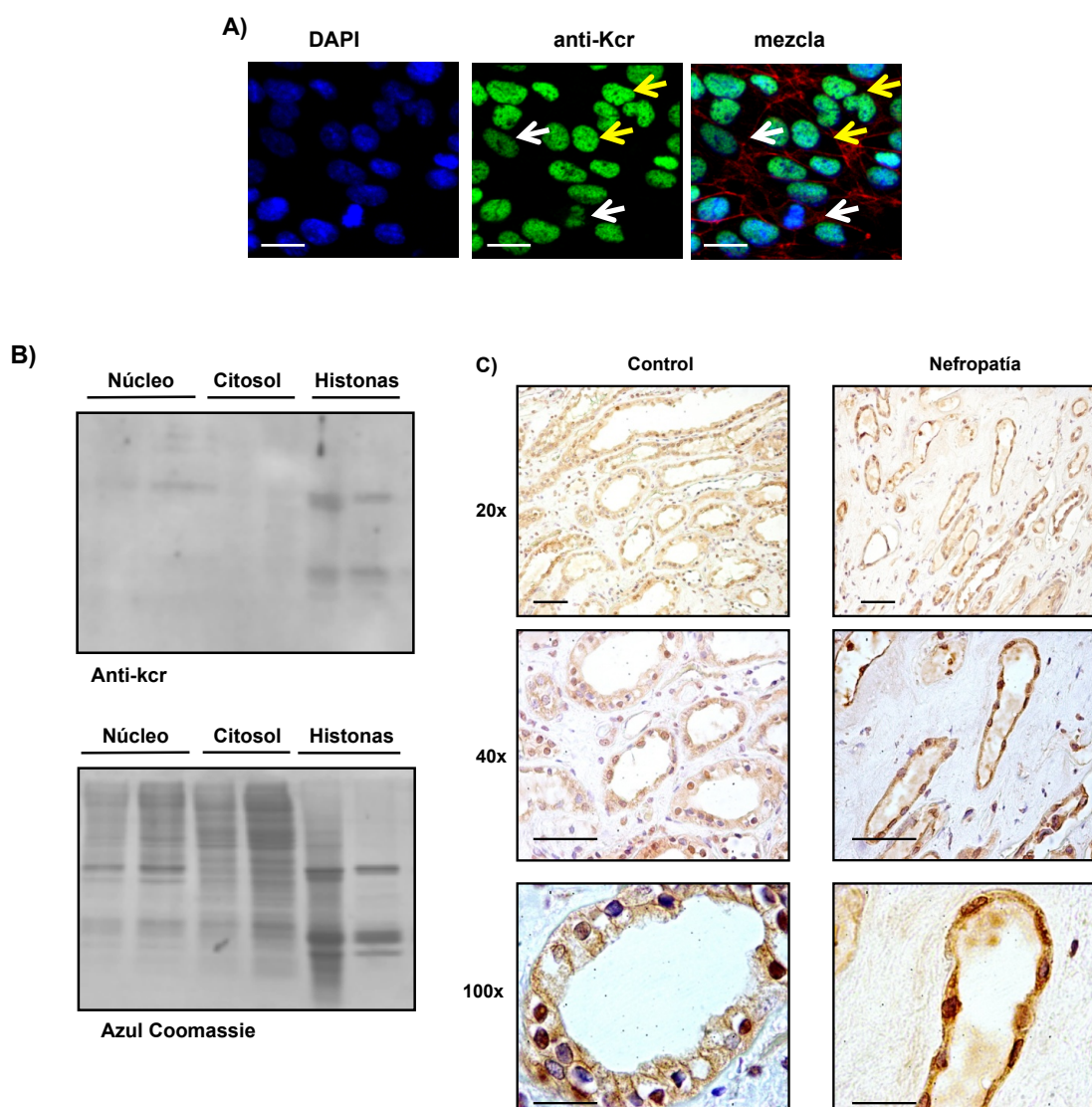
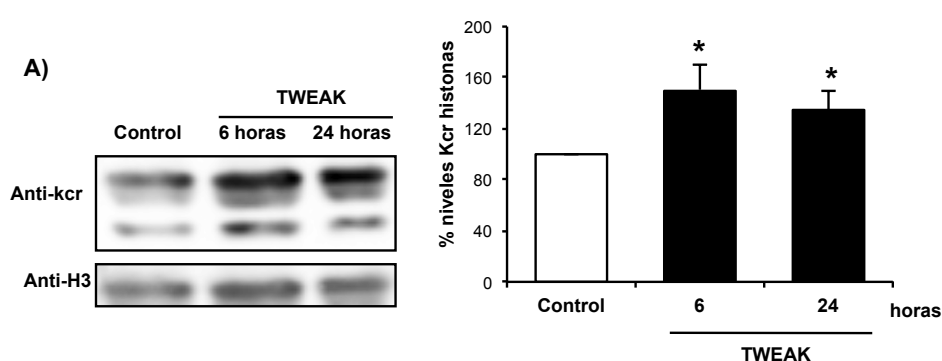


Figura 8. Localización de la crotonilación. **A)** La localización nuclear de la crotonilación de histonas (verde) se observa en células murinas de túbulo proximal en cultivo. Núcleos teñidos con DAPI (azul) y la actina citoesquelética con faloidina fluorescente (rojo). Se observan varios grados de crotonilación de histonas: algunas células tienen una tinción menos intensa (flechas blancas) que otras (flechas amarillas). Barra de escala, 5 μ m. **B)** Células tubulares en cultivo. Fuerte señal de Kcr en el extracto de histonas una banda en el extracto nuclear a la altura correspondiente a las histonas y ausencia de banda en el extracto citosólico. Western blot y tinción azul Coomassie. **C)** La inmunohistoquímica también localiza la crotonilación de histonas en las células tubulares en riñones humanos. Barra de escala, 50 μ m (aumento original x200), detalle: barra de escala 50 μ m (aumento original x400) y barra de escala 20 μ m (aumento original x1000).

2. TWEAK aumenta la crotonilación de histonas en células tubulares renales de ratón en cultivo

Otra de las hipótesis planteadas en esta tesis fue que mediadores inflamatorios del FRA podrían modular la crotonilación de histonas. TWEAK es un mediador clave en el FRA que produce la respuesta inflamatoria en células tubulares en cultivo pero no es directamente citotóxico si se usa en ausencia de otros mediadores de inflamación (Sanz et al., 2010a, Izquierdo et al., 2012), por lo que se estudió el efecto de TWEAK sobre la crotonilación de histonas en células renales. Se observó que TWEAK aumenta la crotonilación de histonas a 6 y 24 horas en células tubulares en cultivo (**Figura 5.A**). Estos resultados sugieren que las citoquinas inflamatorias podrían regular el estado de la crotonilación de histonas en las células renales.

En este punto, decidimos explorar si la citotoxicidad podría directamente producir variaciones en los niveles de crotonilación de histonas. Como en el caso del FRA inducido por ácido fólico, el producido por isquemia-reperfusión y otras formas de FRA; el cisplatino *in vivo* produce una respuesta inflamatoria que amplifica el daño renal (Zhang et al., 2008, Baek et al., 2015). Sin embargo, al contrario que TWEAK, el cisplatino sí que tiene un efecto tóxico directo sobre las células tubulares en cultivo. A este respecto, el cisplatino a concentraciones que inducen toxicidad directa en células tubulares en cultivo, no modificó la crotonilación de histonas (**Figura 9.B**). Estos resultados indican que la citotoxicidad y la crotonilación de histonas pueden ser disociadas en células tubulares en cultivo y aboga por la implicación de factores adicionales *in vivo*.



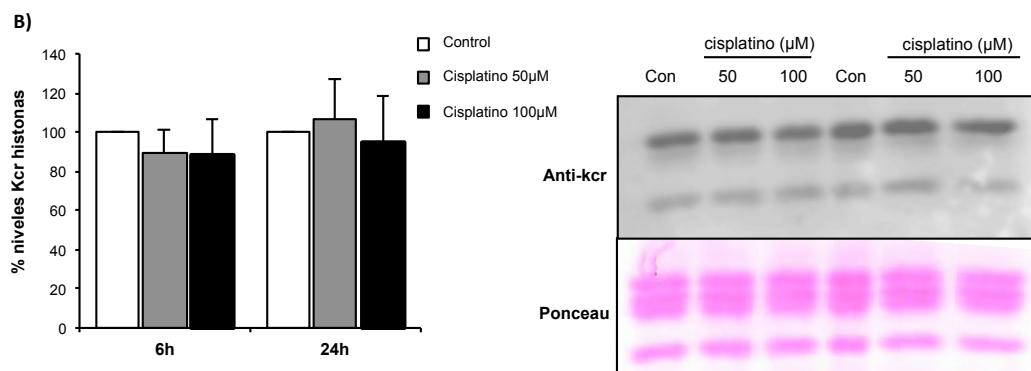


Figura 9. TWEAK aumenta la crotonilación de histonas in vitro, y el cisplatino NO produce cambios. A) Kcr en células murinas de túbulo proximal estimuladas con 100 ng/ml de TWEAK. Western blot. Datos de 5 experimentos independientes, expresado como media±error; * $p < 0,05$ vs control. **B)** Western blot de Kcr en células murinas de túbulo proximal en cultivo estimuladas con cisplatino 50 y 100 µM. Datos de 3 experimentos independientes, expresado como media±error; * $p < 0,05$ vs control.

3. El crotonato aumenta la crotonilación de histonas y provoca respuestas biológicas en células tubulares de ratón en cultivo

Posteriormente, buscamos potenciales genes diana de la crotonilación de histonas. Para ello seleccionamos, en una base de datos transcriptómica, genes representativos cuya expresión estuviera diferencialmente regulada en el FRA. PGC-1 α es un regulador de la biogénesis mitocondrial que está disminuido en el FRA, mientras que SIRT3 es una decrotonilasa, y cada uno regula la expresión del otro. Por lo tanto, se eligió a PGC-1 α como gen representativo de los genes regulados a la baja durante el FRA, ya que regula la expresión de SIRT3 (Giralt et al., 2011, Kong et al., 2010, Bell and Guarente, 2011). Los análisis de ChIP-seq usando el anticuerpo *pan-crotonyl-lysine* mostraron que PGC-1 α y SIRT3 están más enriquecidos en histonas crotoniladas en células tubulares tratadas con TWEAK y en riñones con FRA que en los control (Figura 10).

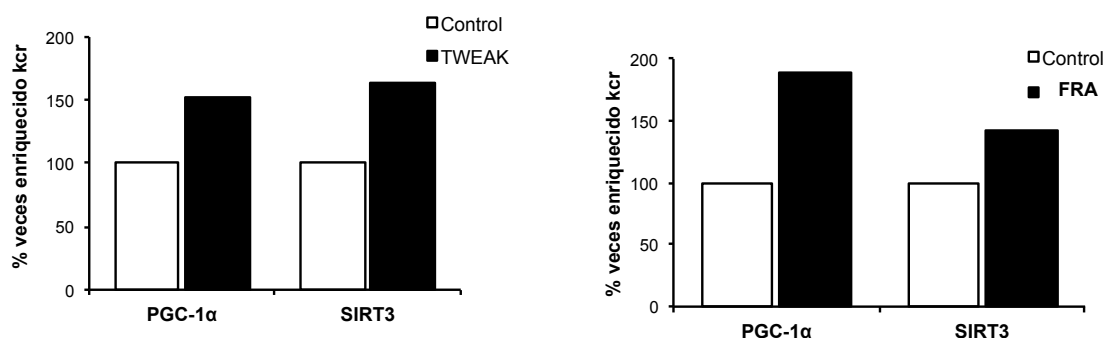


Figura 10. Análisis ChIP-seq usando el anticuerpo anti-Kcr. La gráfica de la izquierda muestra el experimento en células tubulares en cultivo estimuladas con 100 ng/ml de TWEAK a 6h (*pool* de los datos de 3 experimentos independientes), y la gráfica de la derecha muestra tejido renal de ratones con FRA a 24h (*pool* de los datos de 6 animales por grupo).

Para estudiar el efecto de la crotonilación sobre la expresión de PGC-1 α y SIRT3, las células fueron pretratadas con crotonato ya que el crotonato exógeno aumenta la crotonilación de histonas en células tubulares en cultivo (**Figura 11.A**). Estos resultados son consistentes con lo descrito en otros tipos celulares no renales (Tan et al., 2011, Sabari et al., 2015). El crotonato aumentó la expresión de PGC-1 α en células tubulares tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína (**Figura 11.B-C**). Como gen representativo de los regulados al alza en el FRA, se eligió el gen CCL2 que codifica para la quimioquina MCP-1 promotora de daño renal (Sanz et al., 2010a). El crotonato disminuyó CCL2 a nivel de RNAm en células en cultivo (**Figura 11.D**).

El conjunto de todos estos resultados nos sugiere que la crotonilación de histonas podría tener un papel protector en el daño renal promoviendo el aumento de genes protectores y la disminución de genes implicados en el daño tisular. El crotonato también aumentó los niveles de RNAm de SIRT3 en células tubulares de una manera tiempo-dependiente (**Figura 11.E**), lo que podría indicar la activación de un lazo de retroalimentación negativa.

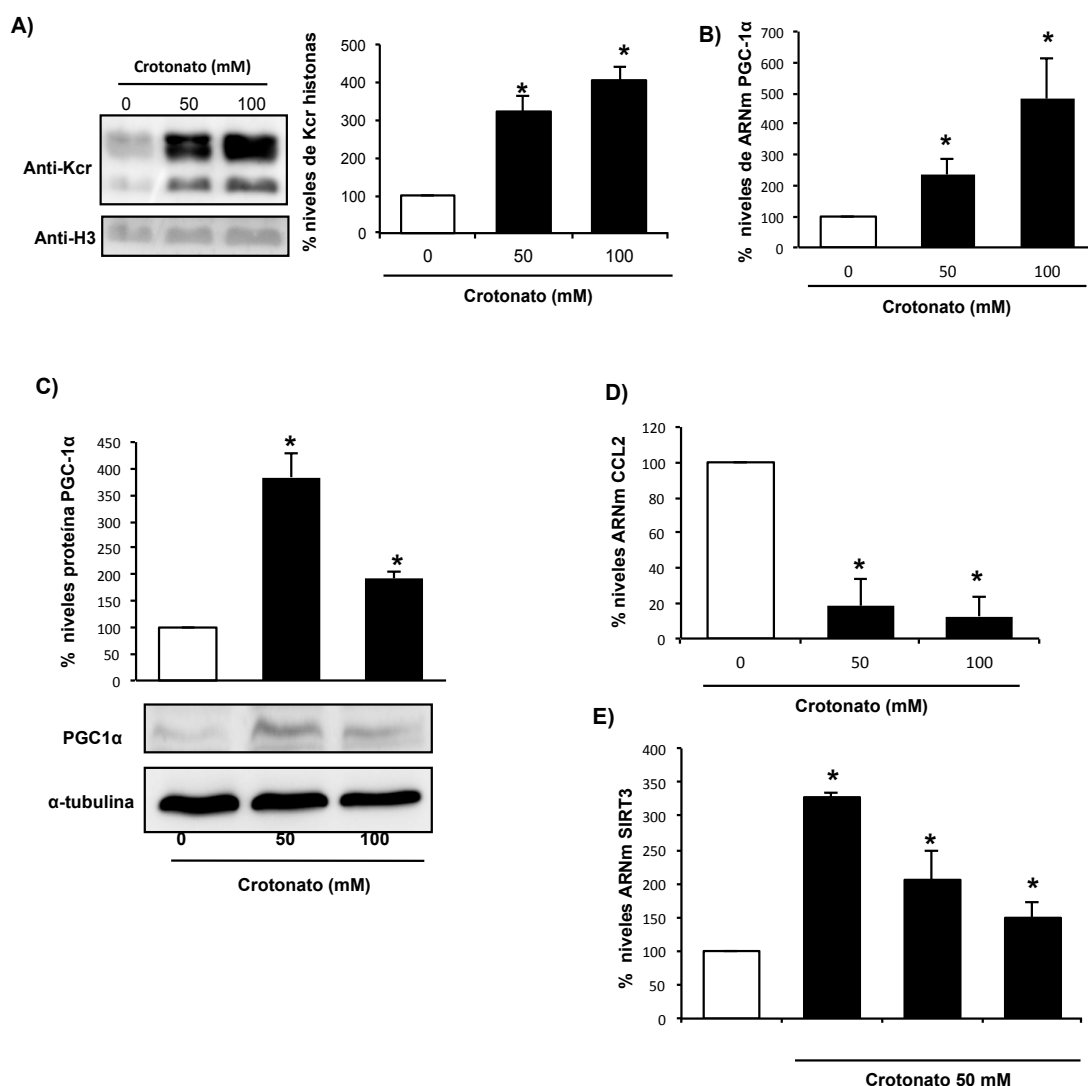


Figura 11. El crotonato aumenta la crotonilación de histonas y modifican la expresión génica en células de túbulo proximal en cultivo. Las células fueron estimuladas con 0, 50 y 100 mM de crotonato a 24h. **A)** Cuantificación de la crotonilación de histonas y western blot característico. Media±error de 3 experimentos independientes; * $p<0,05$ vs crotonato 0 mM. **B, D)** Niveles de ARNm de PGC-1 α y CCL2. Datos de 8 experimentos independientes expresados como media±error, $p<0,05$ vs control. **C)** PGC-1 α western blot. Datos de 4 experimentos independientes expresados como media±error, $p<0,05$ vs control. **E)** Niveles de ARNm de SIRT3 en células tubulares expuestas a crotonato 50 mM. Datos de 4 experimentos independientes expresados como media±error, $p<0,05$ vs control.

Mediante estudios de citometría se comprobó que el crotonato no provoca ni muerte ni proliferación en células tubulares en cultivo, medidas como la presencia de células hipodiploides o células en la fase S/M (**Figura 12**), ni tampoco aumentó el número de células levantadas como se observó por microscopía de contraste de fases (**no se muestra**).

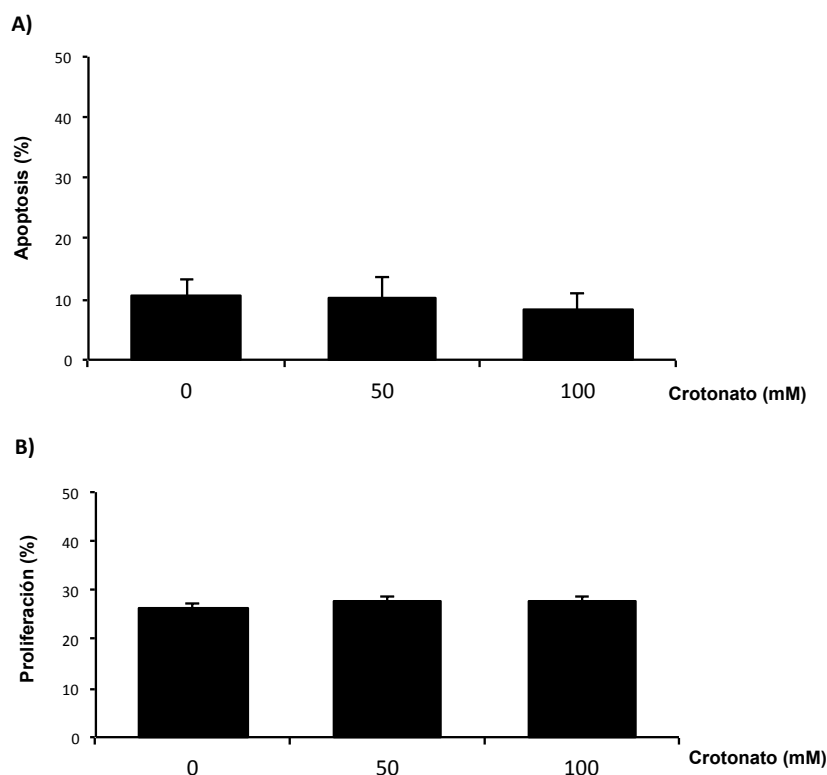


Figura 12. El crotonato no promueve apoptosis ni proliferación en células tubulares en cultivo. Las células tubulares se incubaron con 0, 50 y 100 mM de crotonato durante 24h, se permeabilizaron y tiñeron con yoduro de propidio y se evaluó su contenido de ADN. Datos de 4 experimentos independientes expresados como media±error. Las células hipodiploides se consideraron apoptóticas y las de las fases S+M, proliferantes.

Para comprobar si los cambios de osmolaridad en el medio modificaban la crotonilación de histonas se usó manitol a concentraciones equimolares a las concentraciones de crotonato usadas, y se comprobó que la osmolaridad no modifica la crotonilación de histonas (**Figura 13**).

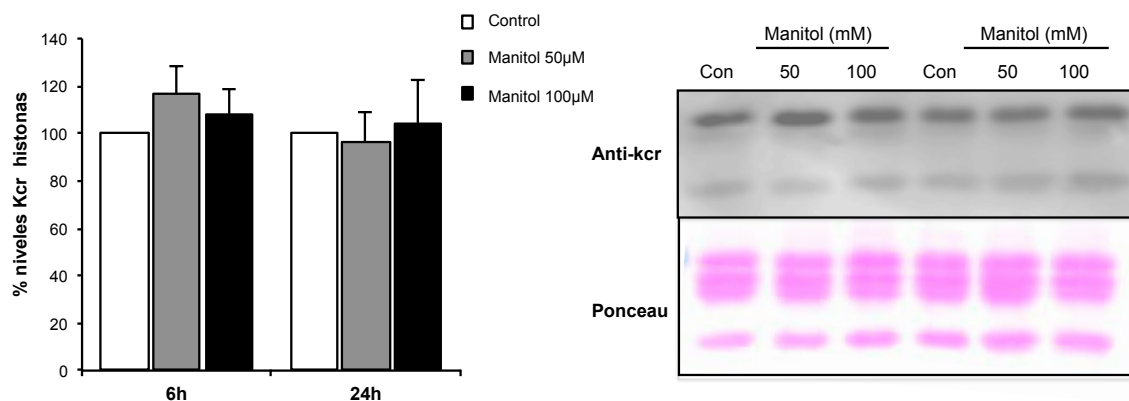


Figura 13. Los cambios de osmolaridad no modifican los niveles de crotonilación de histonas en células tubulares en cultivo. Las células se incubaron con 0, 50 y 100 mM de manitol durante 6 y 24h. Cuantificación de la crotonilación de histonas y Western blot representativo. media±error de 3 experimentos independientes; * $p < 0,05$ vs 0 mM manitol.

4. El crotonato aumenta la crotonilación de histonas y modula la expresión génica en el riñón murino

A continuación, se estudió si el crotonato modulaba la crotonilación de histonas del riñón *in vivo*. La administración sistémica de crotonato aumentó la crotonilación de histonas en el riñón de ratón de una manera dosis y tiempo-dependiente (**Figura 14.A-B**).

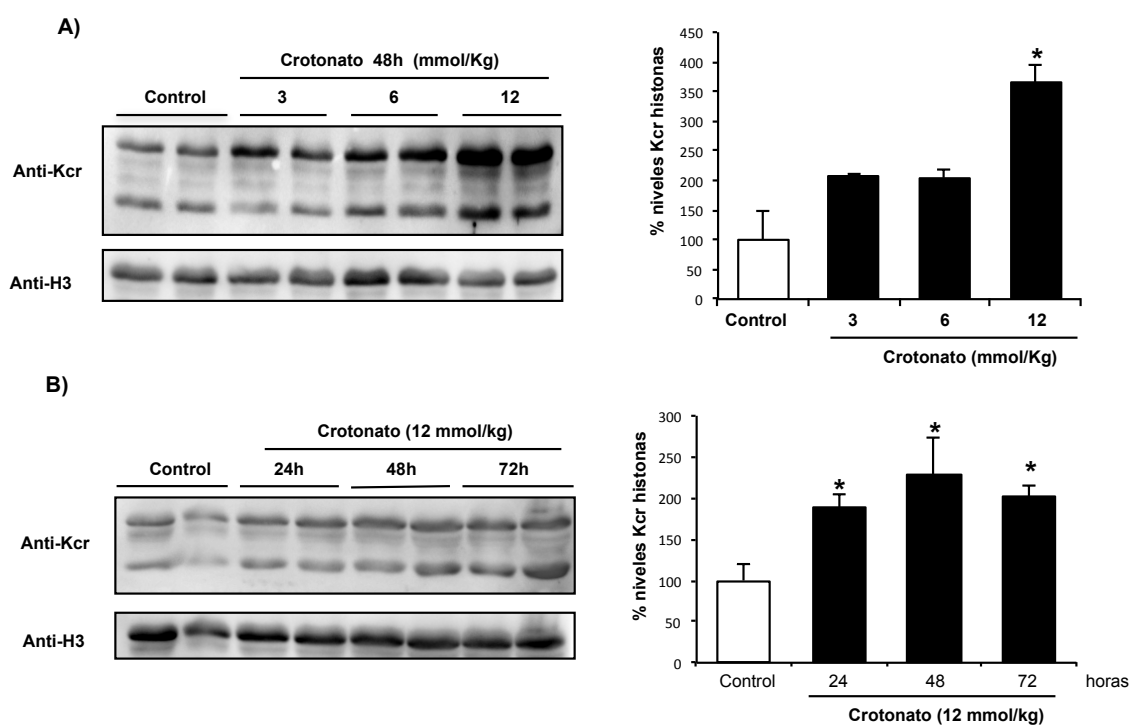


Figura 14. El crotonato aumenta la crotonilación de histonas en el riñón de ratón. Los ratones fueron tratados con crotonato a diferentes dosis y a diferentes tiempos. La crotonilación de histonas se midió por Western blot. A) Curva dosis-respuesta a las 48h. Los ratones

Resultados

recibieron vehículo o crotonato a las dosis de 3, 6 y 12 mmol/kg. Media \pm error de 4 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs control. **B)** Curva de tiempo. Los ratones fueron sacrificados a las 24, 48 y 72h tras la inyección de 12 mmol/kg de crotonato o de vehículo (control). Media \pm error de 4 ratones por grupo. * $p < 0,05$ vs control.

La dosis de 6 mmol/kg de crotonato no produjo cambios significativos en la crotonilación de histonas en el riñón (**Figura 15.A**) ni en los niveles de ARNm de PGC-1 α (**Figura 15.B**) a las 24 horas.

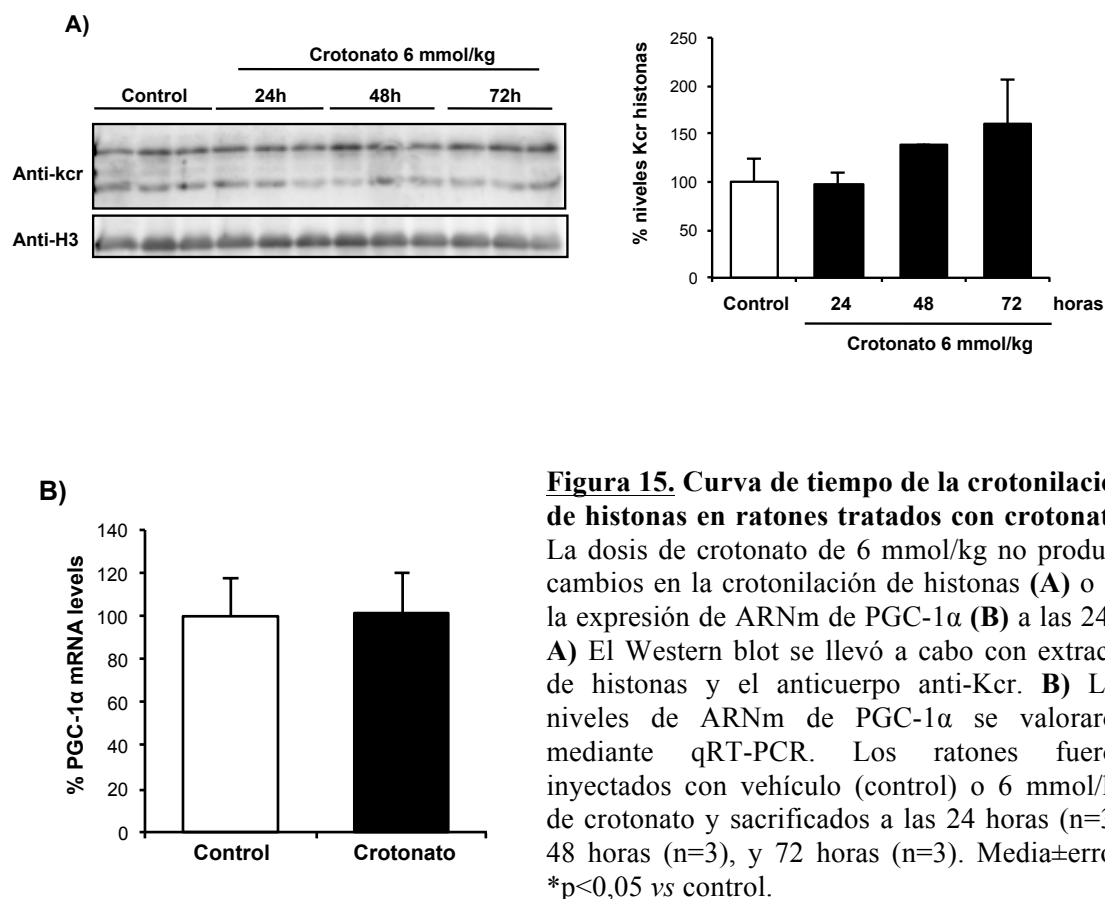


Figura 15. Curva de tiempo de la crotonilación de histonas en ratones tratados con crotonato. La dosis de crotonato de 6 mmol/kg no produce cambios en la crotonilación de histonas (**A**) o en la expresión de ARNm de PGC-1 α (**B**) a las 24h. **A)** El Western blot se llevó a cabo con extracto de histonas y el anticuerpo anti-Kcr. **B)** Los niveles de ARNm de PGC-1 α se valoraron mediante qRT-PCR. Los ratones fueron inyectados con vehículo (control) o 6 mmol/kg de crotonato y sacrificados a las 24 horas (n=3), 48 horas (n=3), y 72 horas (n=3). Media \pm error, * $p < 0,05$ vs control.

Por ello, la dosis de 12 mmol/kg de crotonato fue la elegida para posteriores experimentos. Esta dosis produjo un aumento de la crotonilación de histonas en el riñón (**Figura 16**), y de los niveles de ARNm (**Figura 16.A**) y de proteína (**Figura 16.B**) de PGC-1 α , y disminuyó los niveles renales de CCL2 a nivel de RNAm (**Figura 16.C**). De este modo, la potencial acción nefroprotectora del crotonato observada en células tubulares en cultivo (aumento de la expresión del gen nefroprotector PGC-1 α y disminución de la expresión de genes inflamatorios) se reproducía *in vivo*.

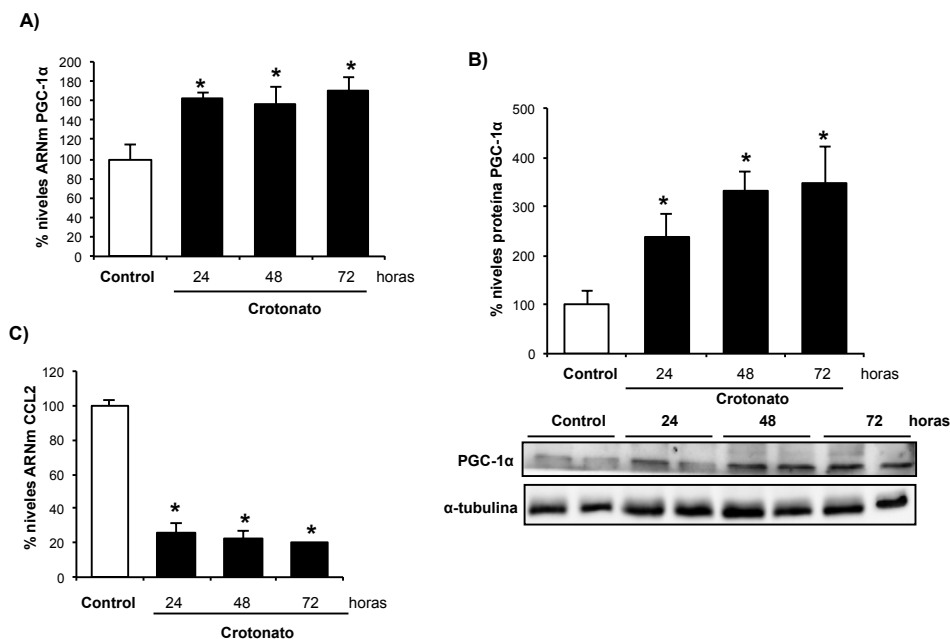


Figura 16. El crotonato aumenta los niveles de ARNm de PGC-1α y disminuye los de CCL2 en riñón de ratón. Los ratones fueron tratados con 12 mmol/kg de crotonato a diferentes tiempos. **A,B)** El crotonato aumenta la expresión renal de PGC-1α a nivel de ARNm como se comprobó por qRT-PCR (**A**) y a nivel de proteína, como se comprobó por Western blot (**B**). Media±error de 4 animales por grupo, * $p < 0,05$ vs control. **C)** El crotonato disminuye los niveles renales de ARNm de CCL2. Media±error de 4 animales por grupo, * $p < 0,05$ vs control.

Dado que, la decrotonilasa SIRT3 (Bao et al., 2014) y PGC-1α se regulan el uno al otro bajo condiciones de estrés y en el estado fisiológico (Giralt et al., 2011, Palacios et al., 2009, Shi et al., 2005, Than et al., 2011), se decidió estudiar el efecto del crotonato exógeno sobre la expresión de SIRT3 en el riñón *in vivo* y se comprobó que el crotonato aumentaba la expresión de SIRT3 en el riñón tanto a nivel de ARNm (**Figura 17.A**) como a nivel de proteína (**Figura 17.B**). Esto coincidía con los efectos observados en células tubulares en cultivo y una vez más, sugiere la activación de un lazo de retroalimentación negativa entre los niveles de SIRT3 y los de crotonilación de histonas.

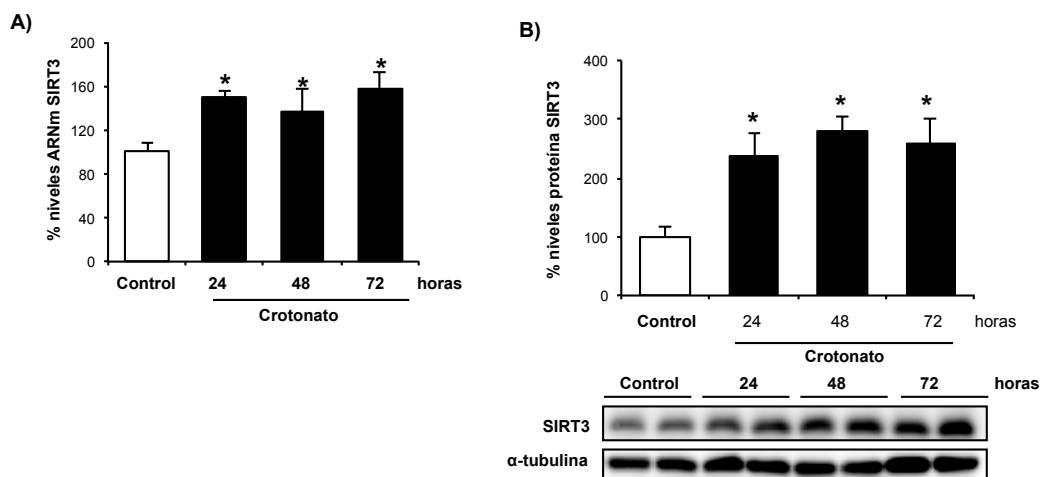
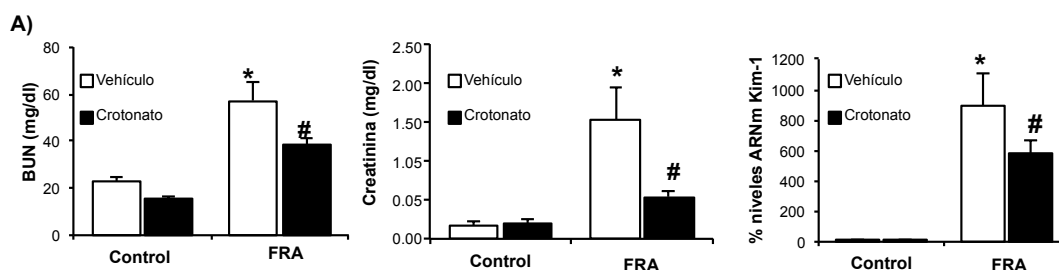


Figura 17. El crotonato aumenta los niveles de ARNm de SIRT3 en riñón de ratón. En el mismo modelo de ratones tratados con 12 mmol/kg de crotonato a diferentes tiempos, el crotonato aumenta los niveles renales de ARNm de SIRT3 como se comprobó por qRT-PCR (A) y los niveles proteicos de SIRT3, como se comprobó por Western blot (B). Media±error de 4 animales por grupo, * $p < 0,05$ vs control.

5. El crotonato protege frente al FRA experimental

A continuación exploramos si el crotonato tenía efecto nefroprotector *in vivo*. Para ello, los ratones fueron tratados con 12 mmol/kg de crotonato y 24 horas después se indujo un FRA mediante una sobredosis de ácido fólico. La inyección de crotonato se repitió cada 24 horas y los ratones fueron sacrificados 72 horas tras el FRA, cuando el fallo renal alcanza su pico (Sanz et al., 2010a). El crotonato disminuyó la gravedad de la insuficiencia renal, como evidenciaron los niveles séricos más bajos de BUN y creatinina, y los niveles más bajos de ARNm del gen KIM-1, marcador de daño renal (Figura 18.A). Una tinción PAS en tejido renal reveló una tendencia hacia la disminución del daño tubular morfológico en los ratones tratados con crotonato (Figura 18.B).



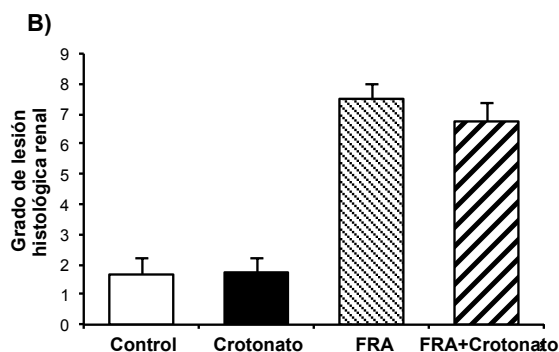


Figura 18. A) El crotonato evita el aumento de los niveles BUN y creatinina séricos y el aumento de la expresión del ARNm de Kim-1 en el FRA. El FRA fue inducido por una sobredosis de ácido fólico en ratones pretratados con 12 mmol/kg de crotonato o vehículo. Todos los ratones se sacrificaron a las 72h. Media±error de 5 ratones por grupo, * $p < 0,05$ vs control vehículo, # $p < 0,05$ vs FRA vehículo. B) **Valoración histológica del daño tubular.** El daño tubular se estimó mediante valoración histológica semicuantitativa de tinción PAS en tejido de riñón de ratones con FRA inducido por ácido fólico y pretratados con 12 mmol/kg de crotonato o vehículo. Media±error. * $p < 0,05$.

El FRA se asoció con un aumento de la expresión de CCL2 (Sanz et al., 2010b) y con una disminución de la expresión de SIRT3 (Figura 19.A-B) en los tiempos estudiados.

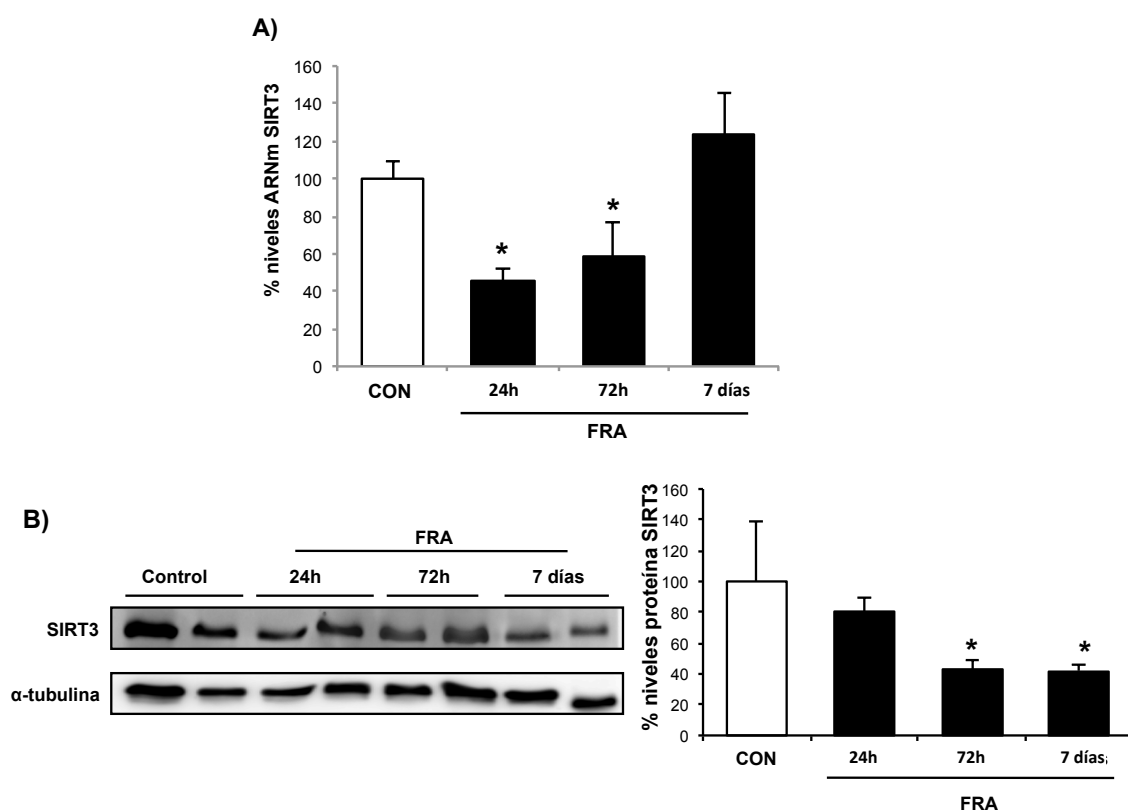


Figura 19. A,B) Curva de tiempo de la disminución de SIRT3 renal en el FRA experimental. Los niveles renales de ARNm de SIRT3 disminuyen transitoriamente en el FRA,

qRT-PCR (A). Los niveles proteicos de SIRT3 también disminuyen en el FRA en los tiempos estudiados (B). Media±error de 5 ratones por grupo. * $p<0,05$.

La administración sistémica de crotonato previno la disminución de los niveles renales de PGC-1 α y SIRT3 en el FRA (Figura 20.A,B,D,E), y el aumento de los niveles de ARNm de CCL2 (Figura 20.C). Esto sugiere un efecto protector del crotonato, y por consiguiente de la crotonilación de histonas, frente a la inflamación y el estrés mitocondrial durante el FRA.

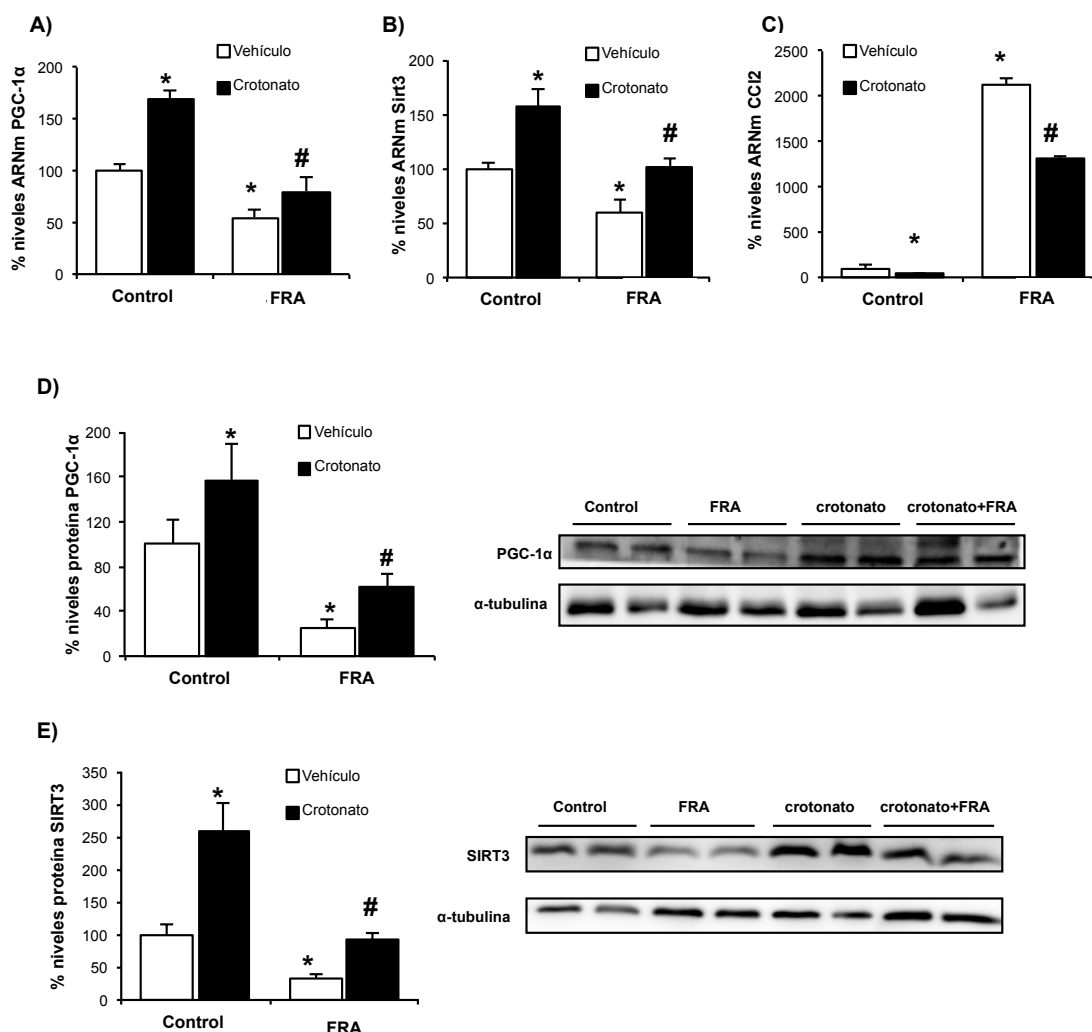


Figura 20. El crotonato evita la disminución de PGC-1 α y SIRT3 así como el aumento de CCL2 en el FRA experimental. El FRA fue inducido por una sobredosis de ácido fólico en ratones pretratados con 12 mmol/kg de crotonato o vehículo. Todos los ratones se sacrificaron a las 72h. A-C) El crotonato previno el descenso del ARNm de PGC-1 α (A), el descenso del ARNm de SIRT3 (B), y el aumento del ARNm de CCL2 (C). Media±error de 5 ratones por grupo, * $p<0,05$ vs control vehículo, # $p<0,05$ vs FRA vehículo. D, E) Los niveles proteicos de PGC-1 α renal (D) y SIRT3 (E) disminuyen durante el FRA y esto lo evita un pretratamiento con crotonato. Western blot de proteína total de riñón. Media±error de 5 ratones por grupo, * $p<0,05$ vs control vehículo, # $p<0,05$ vs FRA vehículo.

6. TWEAK disminuye SIRT3 y el crotonato lo impide

Se ha descrito recientemente que el aumento de la crotonilación de histonas en respuesta al crotonato dependería del aumento en la disponibilidad del sustrato (crotonil-CoA) (Sabari et al., 2015). Sin embargo, el mecanismo de aumento de la crotonilación de histonas tras la estimulación con TWEAK aún no se conoce. Por ello, se exploró si TWEAK regulaba la expresión de la decrotonilasa SIRT3 y se comprobó que TWEAK disminuye los niveles de ARNm y proteína de SIRT3 tanto *in vitro*, en células tubulares en cultivo (**Figura 21.A-B**), como *in vivo*, en el riñón de ratón (**Figura 21.C-D**).

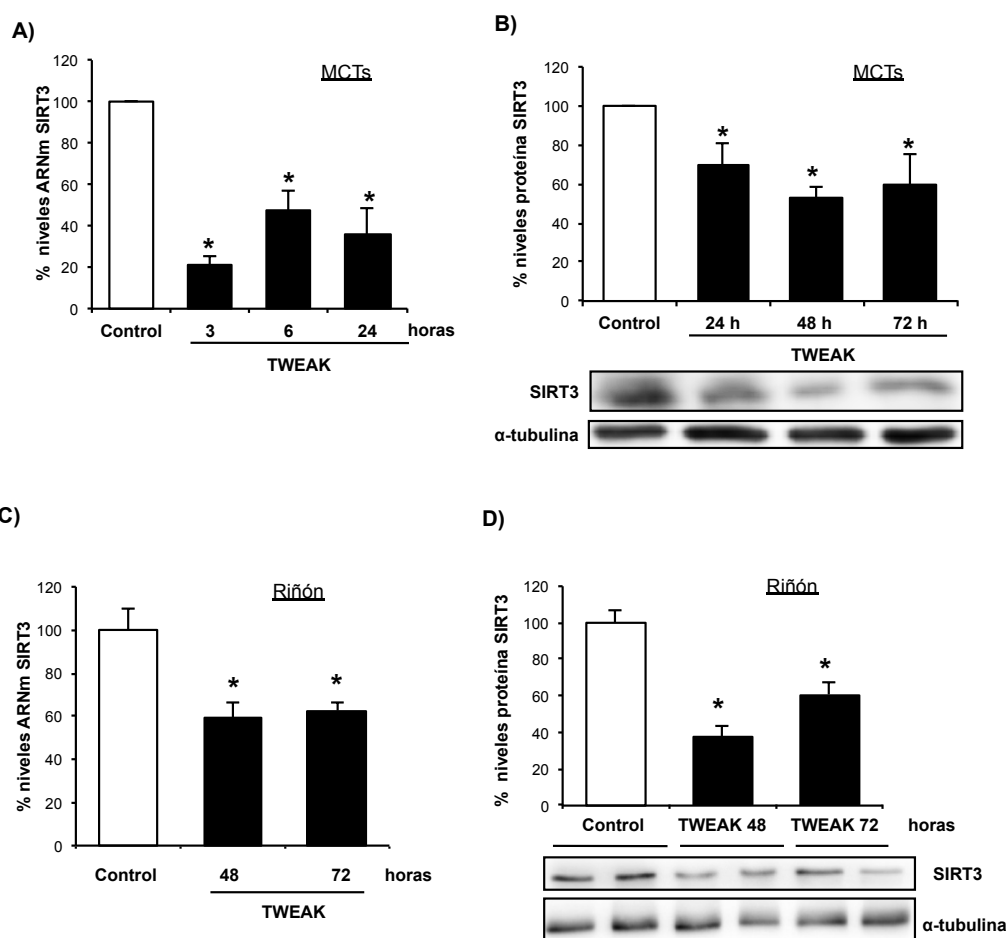


Figura 21. TWEAK disminuye SIRT3 *in vitro* e *in vivo*. **A)** Niveles de ARNm de SIRT3 en células tubulares incubadas con 100 ng/ml de TWEAK. Datos de 3 experimentos independientes expresado como media±error; * $p < 0,05$ vs control. **B)** Niveles de proteína SIRT3 total en células tubulares incubadas con 100 ng/ml de TWEAK a diferentes tiempos. media±error de 3 experimentos independientes; * $p < 0,05$ vs control. **C)** Niveles renales de ARNm de SIRT3 en ratones tratados con TWEAK. Media±error de 5 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs control. **D)** Niveles proteicos en riñón de SIRT3 en ratones tratados con TWEAK a diferentes tiempos. Media±error de 5 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs control.

El crotonato evitó la disminución de SIRT3 inducida por TWEAK en células tubulares en cultivo (**Figura 22.A-B**). El conjunto de estos datos sugiere TWEAK aumenta la crotonilación de histonas en el riñón al menos en parte por la disminución de SIRT3.

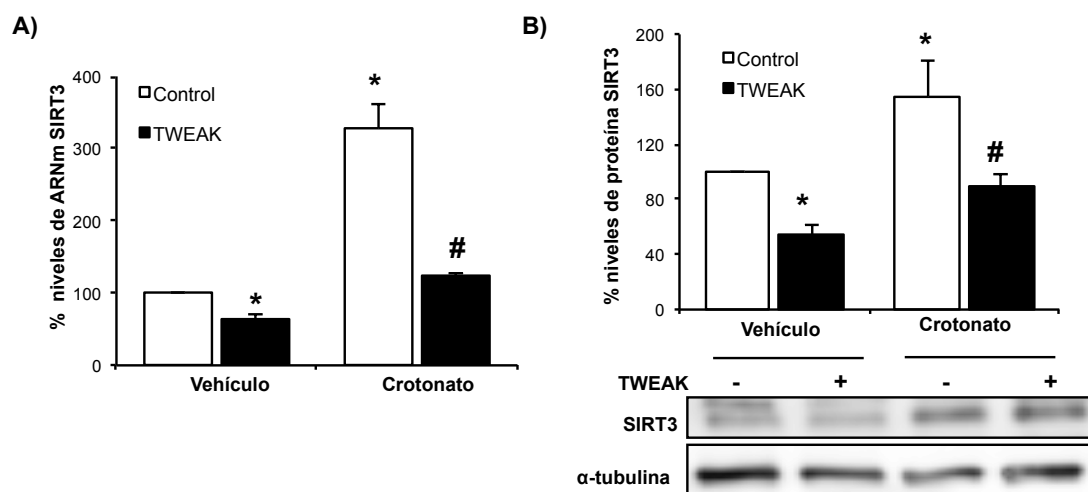


Figura 22. El crotonato evita el descenso de SIRT3 inducido por TWEAK en células tubulares en cultivo. **A)** Niveles de ARNm de SIRT3 en células tubulares incubadas con 100 ng/ml de TWEAK junto con 50 mM de crotonato o vehículo, durante 6 horas. Datos de 3 experimentos independientes expresados como media±error, *p<0,05 vs control vehículo; #p<0,05 vs TWEAK vehículo. **B)** Niveles proteicos de SIRT3 en células tubulares incubadas con 100 ng/ml de TWEAK junto con 50 mM de crotonato o vehículo, durante 48 horas. Datos de 4 experimentos independientes expresados como media±error, *p<0,05 vs control vehículo; #p<0,05 vs TWEAK vehículo.

7. TWEAK disminuye PGC-1α en el FRA

La disminución del regulador de biogénesis mitocondrial PGC-1α es un elemento causal de la disfunción renal que se produce durante la sepsis asociada al FRA (Stallons et al., 2014); y tal y como se acaba de describir en esta tesis, el aumento de la crotonilación de histonas aumenta la expresión de PGC-1α en células tubulares en cultivo e *in vivo*. Además SIRT3 y PGC-1α se regulan mutuamente (Shi et al., 2005, Palacios et al., 2009, Than et al., 2011, Giralt et al., 2011). Por ello decidimos explorar la interacción entre inflamación y PGC-1α. PGC-1α es un regulador de la biogénesis mitocondrial cuya expresión estaban disminuida durante el FRA y por TWEAK en bases de datos transcriptómicas generadas por nuestro grupo con un modelo experimental de FRA y en células tubulares de riñón (MCT) estimuladas con TWEAK, respectivamente. Por ello caracterizamos los mecanismos por los que TWEAK podría modular los niveles de expresión de PGC-1α en el FRA.

El mecanismo que regula la expresión de PGC-1α durante el daño renal fue estudiado en un modelo murino de FRA inducido por ácido fólico (Sanz et al., 2008). Un análisis transcriptómico en riñón mostró una disminución de los niveles de ARNm de PGC-1α en el

FRA a 24h frente a ratones sanos (ratio FRA/sano en riñón $0,623 \pm 0,479$; $p < 0,01$, FDR: 0,02) (Izquierdo et al., 2012). Mediante qRT-PCR se confirmó una disminución significativa en los niveles de ARNm de PGC-1 α a las 24 y 72 horas tras el daño renal (**Figura 23.A**). Además, se observó una correlación negativa entre los niveles de ARNm de PGC-1 α y los niveles de BUN, un marcador que aumenta con la severidad del FRA (**Figura 23.B**). Al séptimo día los niveles de ARNm de PGC-1 α se han recuperado (**Figura 23.A**), de una manera muy similar a como ocurre con la función renal (**Figura 23.C**).

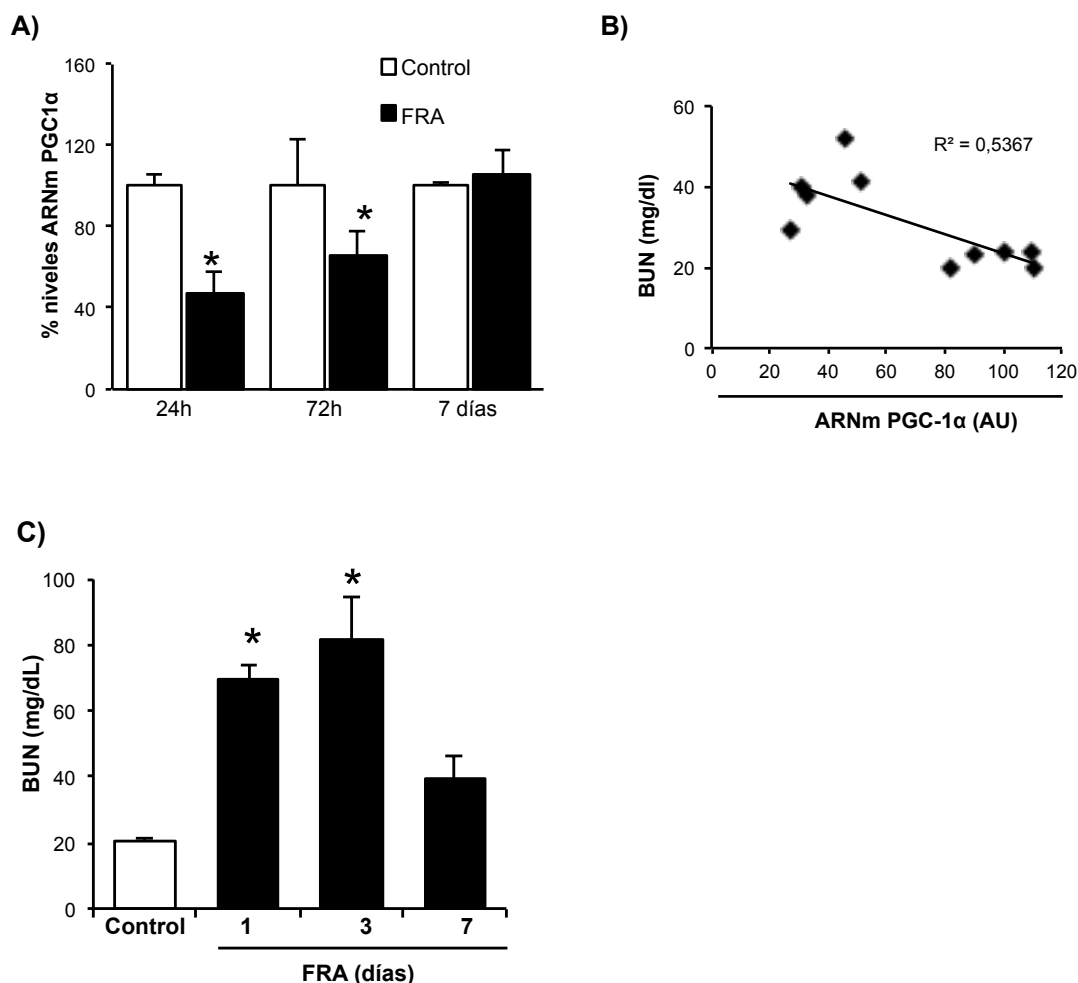


Figura 23. PGC-1 α disminuye en el FRA. **A)** Los niveles renales de ARNm de PGC-1 α se valoraron mediante qRT-PCR en ratones con FRA inducido por una sobredosis de ácido fólico o controles a diferentes tiempos. Media \pm error de 5 animales por grupo. * $p < 0,02$ vs control. **B)** Gráfico de dispersión mostrando la significativa correlación negativa entre la expresión renal del ARNm de PGC-1 α y los niveles de BUN sérico en el FRA a las 72 horas ($n=10$). **C)** Curva de tiempo de los niveles de BUN séricos en ratones con FRA. Media \pm error de 5 animales por grupo. * $p < 0,005$ vs control.

TWEAK modula la expresión de PGC-1 α en células no renales (Shi et al., 2013) y estudiamos el papel de TWEAK en la regulación de la expresión de PGC-1 α en el FRA. Fn14, el receptor de TWEAK, estaba significativamente aumentado en el FRA, se localizaba en las células tubulares (**Figura 24.A, Figura 25**), y su expresión correlacionaba positivamente con el BUN (**Figura 24.B** y negativamente con la expresión de PGC-1 α (**Figura 24.C**).

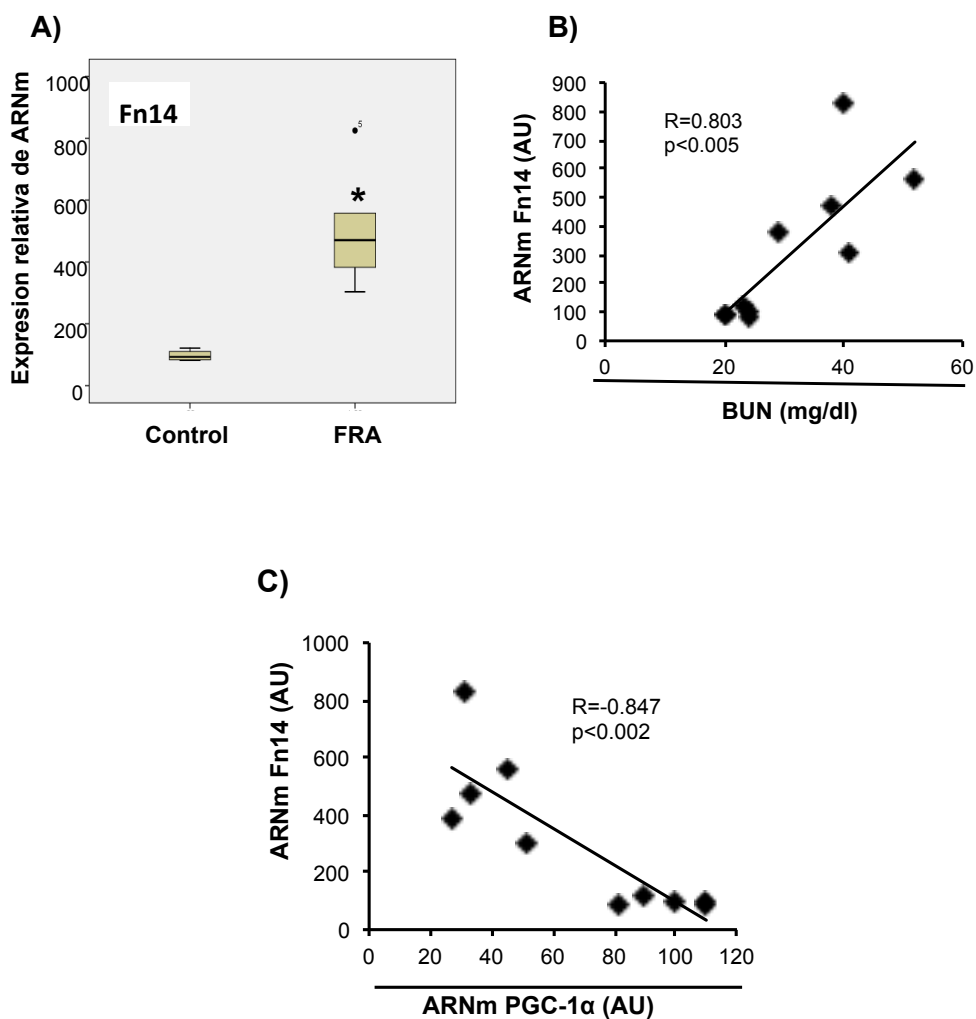


Figura 24. Aumento de Fn14, el receptor de TWEAK en el FRA experimental. A) La expresión renal de ARNm de Fn14 (qRT-PCR) está aumentada en el FRA a 72 horas. B) Gráfico de dispersión mostrando la significativa correlación positiva entre la expresión renal del ARNm de Fn14 y los niveles de BUN en suero. Media \pm error de 5 animales por grupo. * $p<0.01$ vs control. C) Gráfico de dispersión mostrando la significativa correlación negativa entre la expresión renal del ARNm de Fn14 y PGC-1 α en el FRA a las 72 horas (n=10).

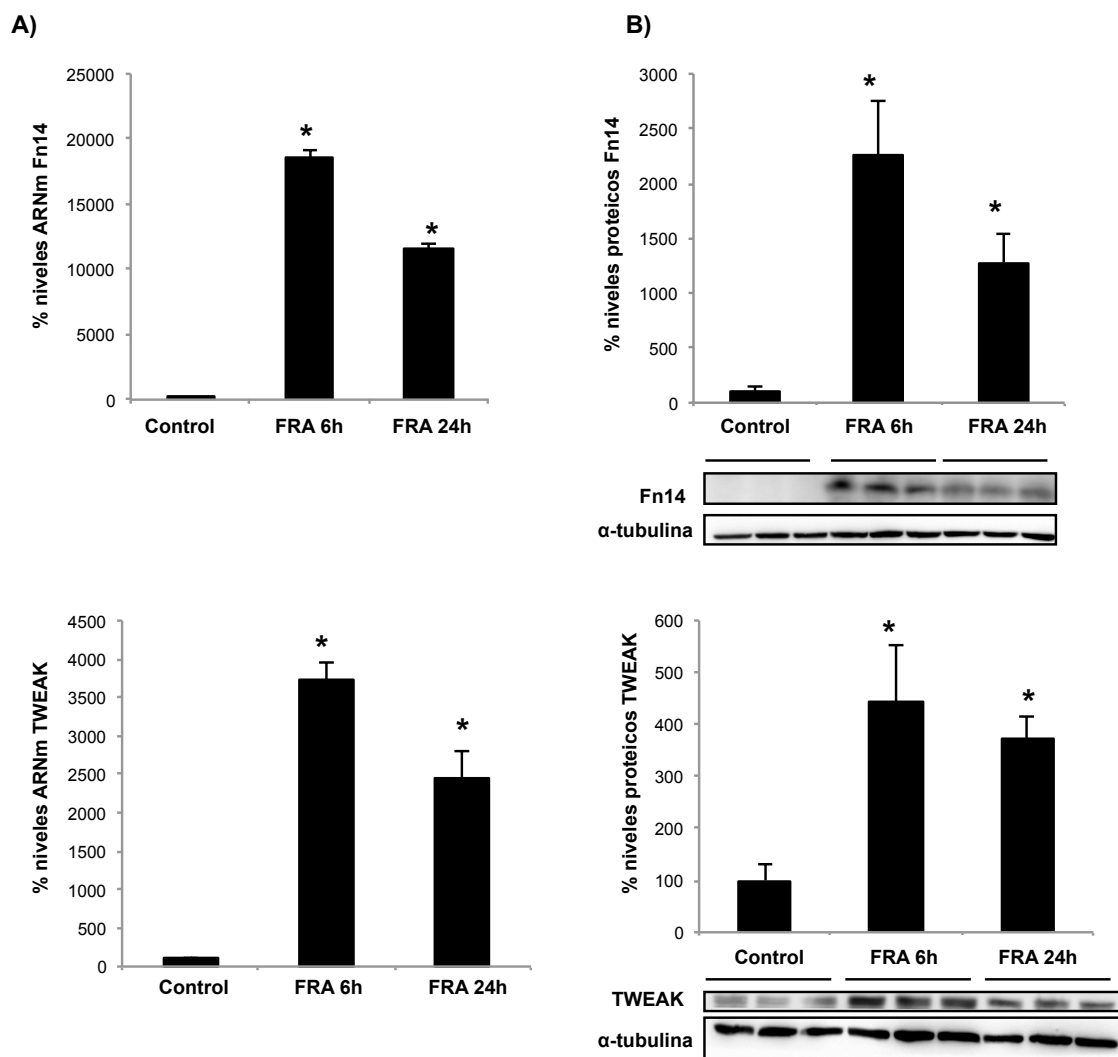


Figura 25. TWEAK y Fn14 aumentan en el FRA inducido por ácido fólico. A) Análisis por qRT-PCR de los niveles renales de ARNm de TWEAK y Fn14 en ratones 6 y 24 horas tras inducir el FRA con ácido fólico. Media±error de 5 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs control. B) Niveles proteicos de TWEAK y Fn14 en ratones 6 y 24 horas tras el FRA inducido por ácido fólico (Western blot). Media±error de 5 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs control.

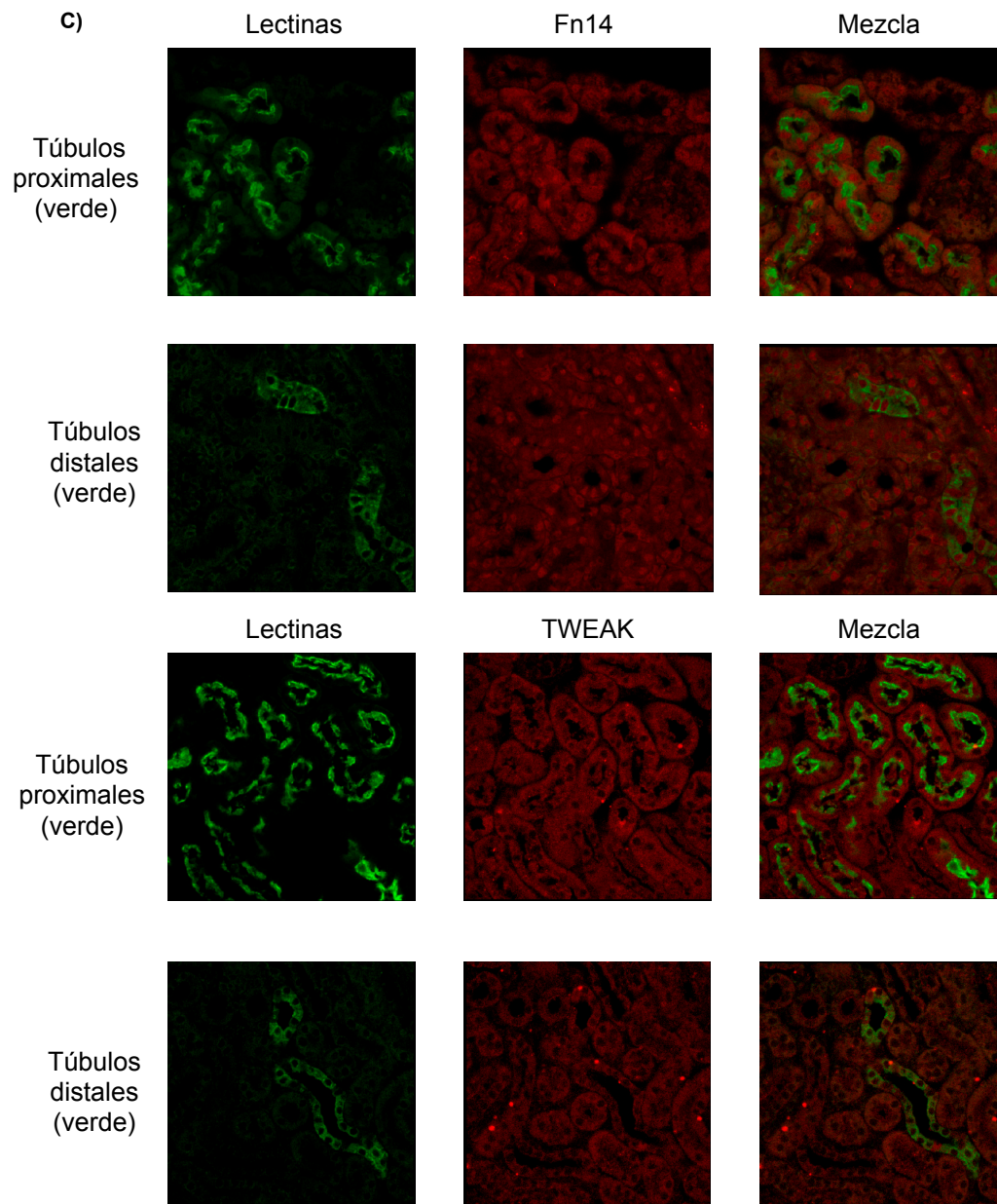


Figura 25. TWEAK y Fn14 se localizan en las células tubulares del riñón. C) Inmunofluorescencia de TWEAK y Fn14 en tejido de riñón. TWEAK o Fn14 (rojo) co-localizan con las lectinas (verde) marcadores de túbulos proximales (*Lotus tetragonolobus*) y distales (*Dolichos biflorus*). Tejido renal de ratones con FRA inducido por ácido fólico a las 24 horas. Aumento original 40X, zoom1.

Resultados

Previamente se había observado que neutralizando los anticuerpos anti-TWEAK evitaba la disfunción renal a las 72h en un modelo de FRA inducido por ácido fólico (Sanz et al., 2014, Sanz et al., 2008) (**Figura 26**).

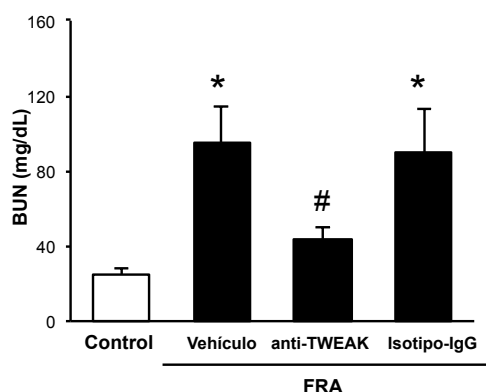


Figura 26. Parámetro de función renal en el modelo de FRA inducido por ácido fólico. La neutralización de TWEAK disminuye los niveles de BUN en ratones con FRA inducido por ácido fólico a las 72 horas. Media±error de 5-6 animales por grupo. *p<0,005 vs control, #p<0.04 vs FRA con/sin IgG control.

Ahora comprobamos que los anticuerpos neutralizantes anti-TWEAK evitaban la disminución de PGC-1 α a nivel de ARNm y de proteína, 72h tras el daño (**Figura 27. A-C**).

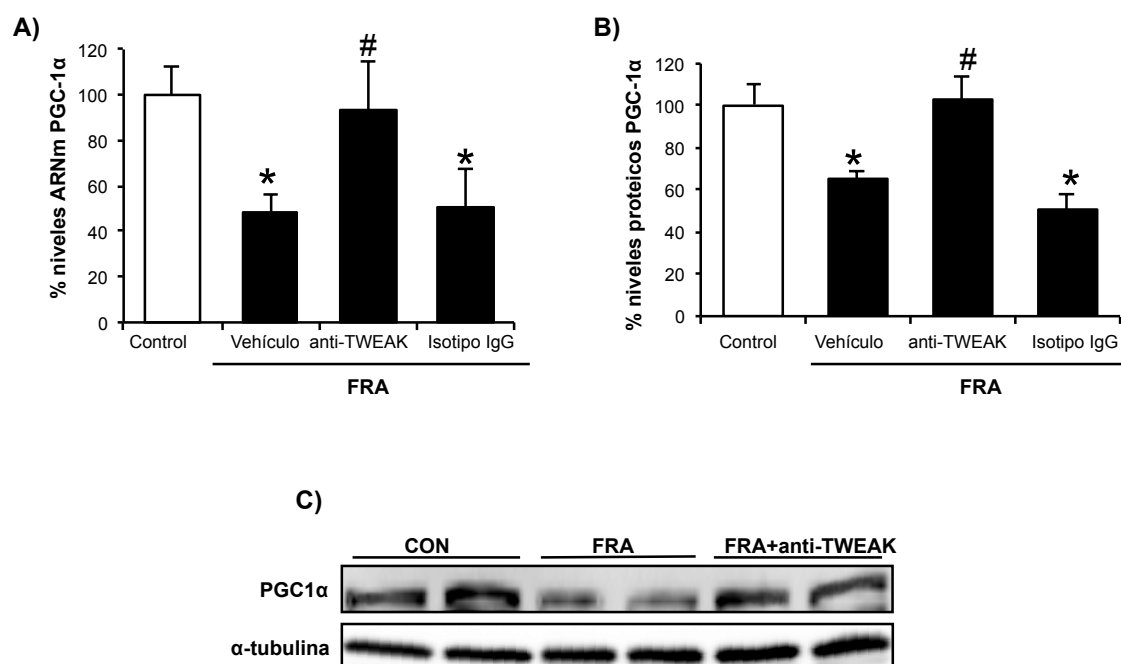


Figura 27. La neutralización de TWEAK evita la disminución de PGC-1 α durante el FRA. A) La neutralización de TWEAK con anticuerpos específicos evita el descenso del ARNm de PGC-1 α en los riñones a 72h tras la inducción del FRA. Media±error de 5-6 animales por grupo.

* $p < 0,01$ vs Control, # $p < 0,03$ vs FRA con/sin gG control. **B)** La proteína total de PGC-1 α en riñón, medida por Western blot, también disminuye en el FRA a 72 horas, y esta disminución se evita con TWEAK. Media \pm error de 5-6 animales por grupo. * $p < 0,01$ vs control, # $p < 0,03$ vs FRA. **C)** Western blot representativo de la expresión de PGC-1 α en lisados de riñón.

Por el contrario, los anticuerpos anti-TWEAK no mejoraban significativamente la disfunción renal temprana (**Figura 28.A**) y no evitaba la disminución de PGC-1 α a las 24h tras el daño (**Figura 28.B**). Estos resultados sugieren una contribución de TWEAK para ampliar y promover la persistencia de la lesión renal a través de la disminución de PGC-1 α .

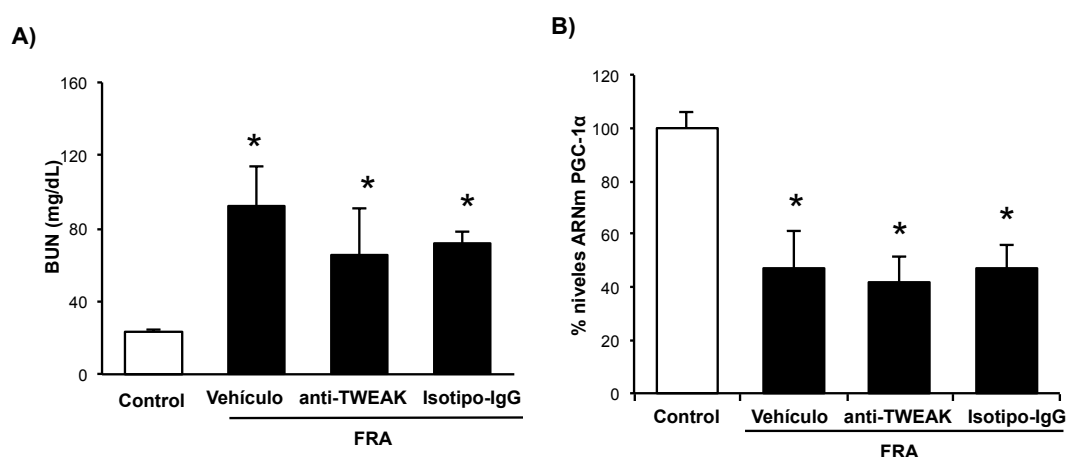


Figura 28. Efecto de la neutralización de TWEAK sobre la disfunción renal temprana. A) La neutralización de TWEAK no disminuye significativamente los niveles de BUN en ratones con FRA inducido por ácido fólico a las 24 horas. Media \pm error de 5-6 animales por grupo. * $p < 0,005$ vs control. **B)** La neutralización de TWEAK no evita la disminución de la expresión de ARNm de PGC-1 α en el FRA a las 24 horas. Media \pm error de 5-6 animales por grupo. * $p < 0,005$ vs control.

8. Supresión de la transcripción de genes mitocondriales durante el FRA

El transcriptoma del FRA inducido por ácido fólico muestra una disminución de genes dependientes de PGC-1 α que codifican para proteínas mitocondriales (**Tabla 1**). Además, el transcriptoma de células tubulares renales de ratón tratadas con 100 ng/ml de TWEAK a 6h, también mostró una disminución de los niveles de ARNm de PGC-1 α (ratio TWEAK/control 0,583 \pm 0,072; $p < 0,004$, FDR: 0,09) y genes diana de PGC-1 α (**Tabla 5**).

Resultados

| Símbolo del gen | Descripción del gen | Riñón de ratón (ratio FRA/control) | p-value | Células murinas de túbulo proximal (ratio TWEAK /control) | p-value |
|-----------------|--|------------------------------------|---------------|---|--------------|
| Ppargc1β | peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta | 0.595±0.29 | 0.001 | 1.067±0.014 | ns |
| Ndufs1 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1 | 0.644±0.3 | 0.0001 | 0.608 ±0.13 | 0.005 |
| Ndufb5 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5 | 0.676±0.12 | 0.0002 | 1.053 ±0.09 | ns |
| Sdha | succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) | 0.751±0.43 | 0.002 | 0.689±0.11 | 0.012 |
| Esrra | estrogen related receptor, alpha | 0.764±0.79 | 0.012 | 1.06 ± 0.05 | ns |
| Ppara | peroxisome proliferator activated receptor alpha | 0.769±0.89 | ns | 0.972±0.03 | ns |
| Cox5b | cytochrome c oxidase, subunit Vb | 0.807±0.61 | 0.014 | 0.985±0.03 | ns |
| Tfam | transcription factor A, mitochondrial | 0.808±0.78 | 0.04 | 0.673 ±0.04 | 0.005 |
| Atp5o | ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 | 0.859±0.7 | 0.048 | 0.997 ±0.03 | ns |

Tabla 5. Expresión relativa de ARNm de los genes diana de PGC-1α en FRA en ratón *versus* riñones control y células murinas epiteliales de túbulo proximal con TWEAK *versus* control

Comparando ambos transcriptomas, se identificaron tres genes codificantes para proteínas mitocondriales regulados por PGC-1α y que estaban significativamente disminuidos en ambas condiciones, *Ndufs1*, *Sdha* y *Tfam*, que codifican para *NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1*, *succinate dehydrogenase complex subunit A flavoprotein (Fp)*, y *mitochondrial transcription factor A*, respectivamente (**Tabla 5**) (Tran et al., 2011, Jarr et al., 2014). Se seleccionaron estos genes para estudios adicionales. Mediante qRT-PCR se confirmó la disminución de los niveles de ARNm de PGC-1α, *Ndufs1*, *Sdha* y *Tfam* durante el FRA (**Figura 29.A**) y se observó una correlación positiva entre la expresión de PGC-1α y la expresión de sus genes diana durante el FRA (**Figura 29.B**). Finalmente, los anticuerpos anti-TWEAK evitaron el descenso en los niveles de ARNm de PGC-1α durante el FRA (**Figura 29.C**). El conjunto de estos resultados sugiere que durante el FRA, la disminución de PGC-1α podría conducir a una disfunción de la mitocondria a través de la disminución de genes dependientes de PGC-1α, y esto sería a su vez dependiente de TWEAK.

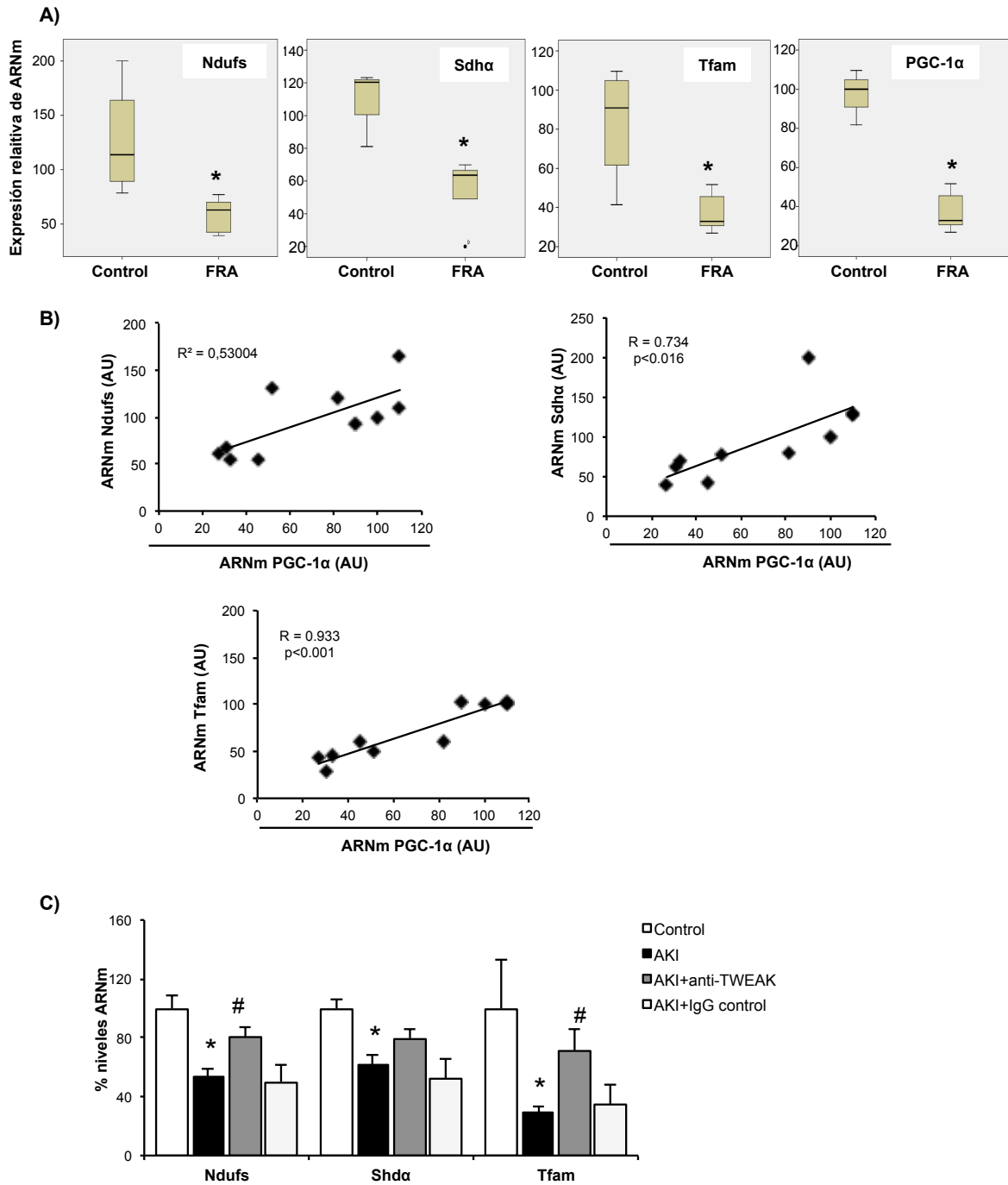


Figura 29. La neutralización de TWEAK preserva la expresión de genes diana de PGC-1α durante el FRA. **A)** Análisis de qRT-PCR de PGC-1α renal y los genes regulados por PGC-1α Ndufs1, Sdha y Tfam, en ratones con FRA a 72 horas. Media±error de 5 animales por grupo. *p<0,05 vs control. **B)** Gráfico de dispersión mostrando la significativa correlación positiva entre la expresión renal de ARNm de PGC-1α y Ndufs1, Sdha y Tfam en ratones con FRA a las 72h (n=10). **C)** La neutralización de TWEAK evita la disminución del ARNm de Ndufs1, Sdha y Tfam a las 72h tras el daño. Media±error de 5-6 animales por grupo. * p<0.02 vs control, #p<0.03 vs FRA con/sin IgG control.

9. La administración de TWEAK exógeno disminuye la expresión de PGC-1 α *in vivo*

El bloqueo de TWEAK evita la disminución de la expresión renal de PGC-1 α durante el FRA, pero esto podría ser un efecto directo o una consecuencia indirecta de la mejora del daño tisular. Por esto, se estudió si TWEAK directamente regulaba la expresión de PGC-1 α renal en riñones sanos *in vivo*. La inyección sistémica de TWEAK disminuyó los niveles de ARNm de PGC-1 α renal *in vivo* a las 48 y 72 horas (**Figura 30.A**). Es más, TWEAK también disminuyó los niveles de proteína de PGC-1 α *in vivo* como se pudo comprobar por Western blot (**Figura 20.B,C**).

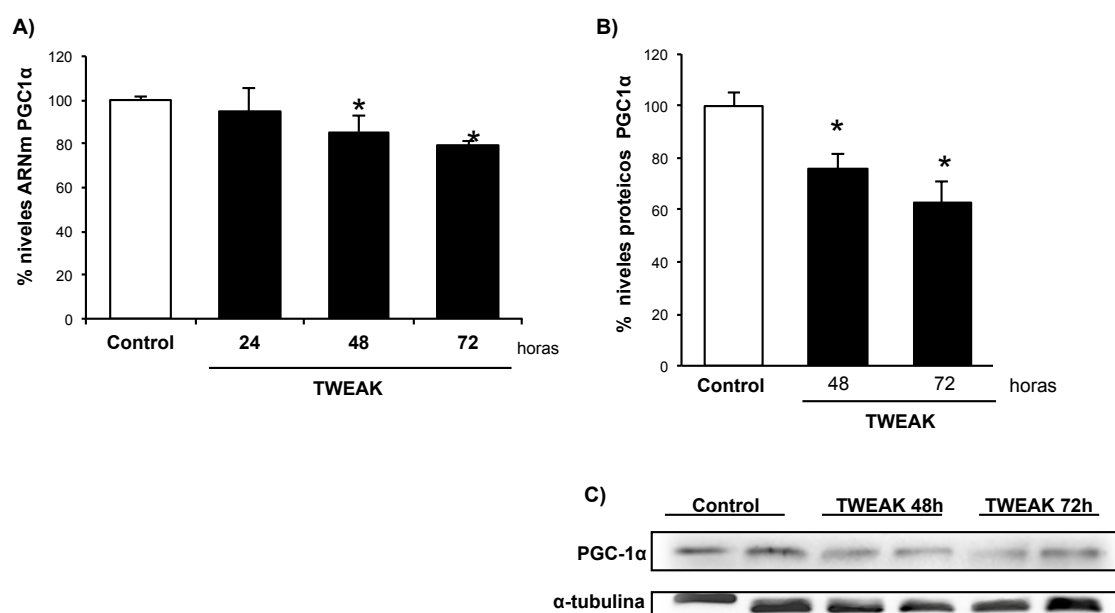


Figura 30. TWEAK disminuye PGC-1 α en los riñones de ratones sanos. **A)** Análisis por qRT-PCR del ARNm de PGC-1 α en riñones de ratones a las 24, 48 y 72 horas tras la administración sistémica de TWEAK. Media \pm error de 5 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs control. **B)** Niveles de proteína total de PGC-1 α en ratones tratados con TWEAK a las 48 y 72 horas, medido por Western blot. Media \pm error de 5 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs control. **C)** Western blot representativo.

10. TWEAK disminuye la expresión de PGC-1 α en células tubulares renales en cultivo

Posteriormente, se estudió el efecto de TWEAK en células tubulares renales en cultivo. TWEAK disminuyó la expresión de PGC-1 α a nivel de ARNm de una manera tiempo dependiente (**Fig. 31.A y B**). TWEAK también disminuye los niveles de proteína de PGC-1 α en células tubulares (**Figura 31.C**). Estos resultados sugieren que la disminución de PGC-1 α inducida por TWEAK en el riñón es un efecto directo de la citoquina sobre las células tubulares renales.

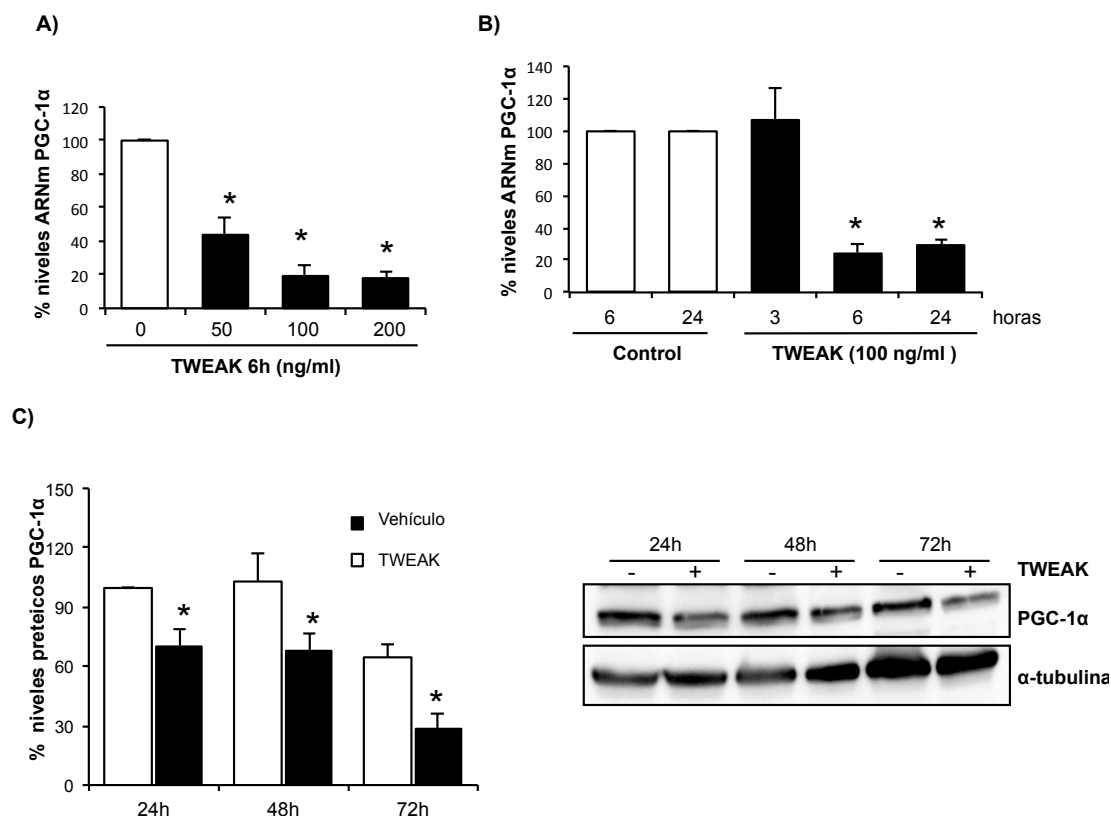


Figura 31. TWEAK disminuye los niveles de PGC-1α en células de túbulo proximal en cultivo. **A)** TWEAK disminuye los niveles de ARNm de PGC-1α (qRT-PCR) de una manera dosis-dependiente en células tubulares a las 6 horas. Media±error de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control. **B)** Curva de tiempo de los niveles de ARNm de PGC-1α (qRT-PCR) en células tubulares en respuesta a 100 ng/ml de TWEAK. Media±error de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control. **C)** Curva de tiempo de los niveles proteicos de PGC-1α en células tubulares incubadas con 100 ng/ml de TWEAK durante diferentes periodos de tiempo. Western blot. Media±error de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control.

11. Impacto negativo de TWEAK sobre la función mitocondrial a través de la disminución de PGC-1α en células tubulares

Dada la buena correlación observada *in vivo* entre la expresión de PGC-1α y la de sus genes diana, se estudió si la disminución de PGC-1α inducida por TWEAK reducía también la expresión de los genes que codificaban para proteínas mitocondriales en células tubulares en cultivo. En las células tubulares TWEAK disminuyó la expresión de los genes *Ndufs1*, *Sdha* y *Tfam* (**Figura 32.A**). Forzando la sobreexpresión de PGC-1α mediante infección adenoviral (**Figura 32.B**) evitó la disminución de *Ndufs1*, *Sdha* y *Tfam* inducida por TWEAK (**Figura 32.C**), sugiriendo que en efecto, la disminución de PGC-1α provocada por TWEAK conducía a la disminución de los genes dependientes de PGC-1α que codifican para proteínas mitocondriales.

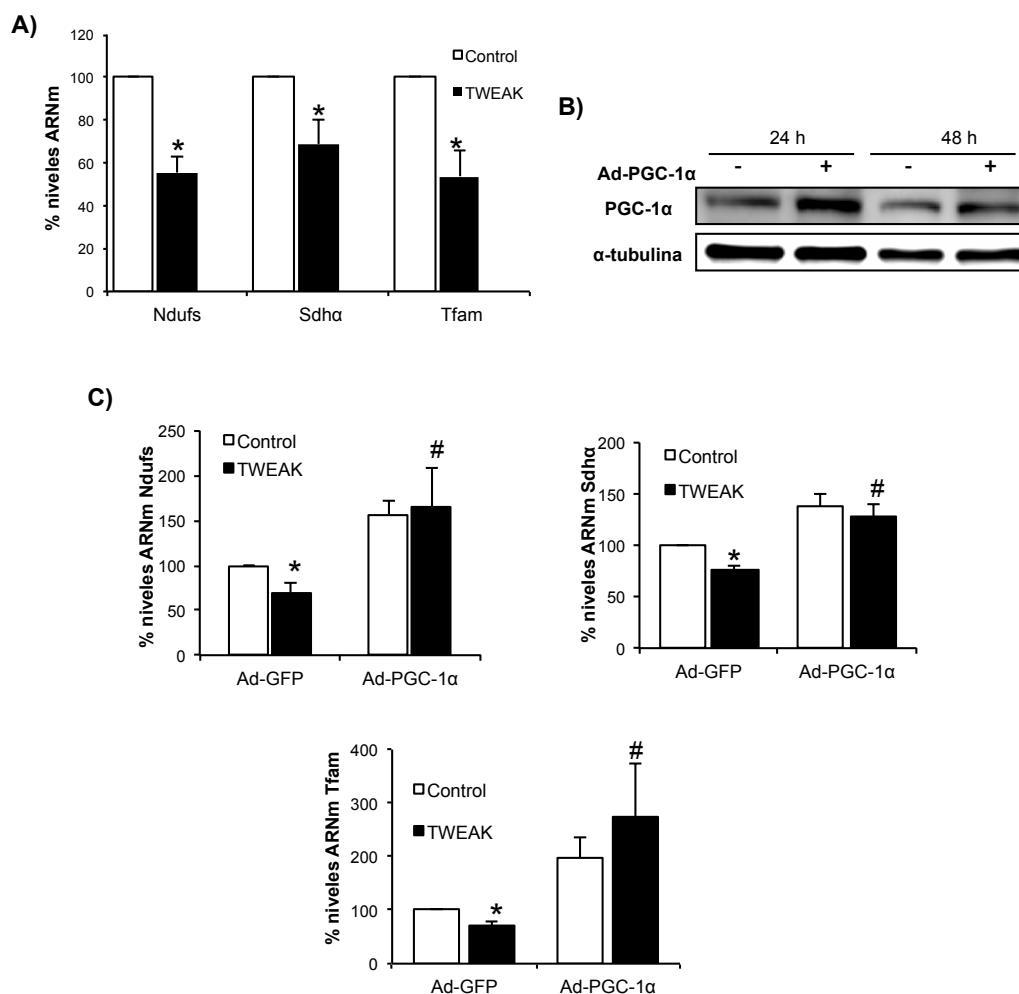


Figura 32. La disminución de PGC-1α inducida por TWEAK provoca una reducción en la expresión de genes codificantes de proteínas mitocondriales. A) Niveles de expresión de los genes mitocondriales Ndufs1, Sdha y Tfam en células tubulares estimuladas con 100 ng/ml de TWEAK durante 48 horas (qRT-PCR). Media±error de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control. **B)** La expresión de PGC-1α está aumentada en células tubulares infectadas con Ad-PGC-1α en comparación con células Ad-GFP. Western blot representativo de 3 experimentos independientes. **C)** Ad-PGC-1α restaura los niveles de los genes mitocondriales disminuidos por TWEAK. Media±error de 3 experimentos independientes. * $p < 0,03$ vs control, # $p < 0,05$ vs TWEAK+Ad-GFP.

Además, TWEAK produce pérdida de potencial de membrana mitocondrial (MMP) como se reflejó la disminución de la tinción TMRM (**Figura 33.A y B**). Dado que la pérdida de MMP es también una característica de muerte celular por apoptosis, se midió la cantidad de células hipodiploides y se comprobó que TWEAK no inducía muerte celular (**Figura 33.C**). Esto va en línea con una detallada caracterización previa de las acciones de TWEAK en células tubulares no estresadas, en la que se describe un aumento de proliferación celular y ausencia de efecto sobre la viabilidad celular (Sanz et al., 2009). La sobreexpresión de PGC-1α producida mediante infección adenoviral (Ad-PGC-1α) evitó la pérdida de MMP producida por TWEAK

(Figura 33.D). Estos resultados indican que TWEAK podría inducir daño mitocondrial a través de la modulación a la baja de los niveles de PGC-1 α .

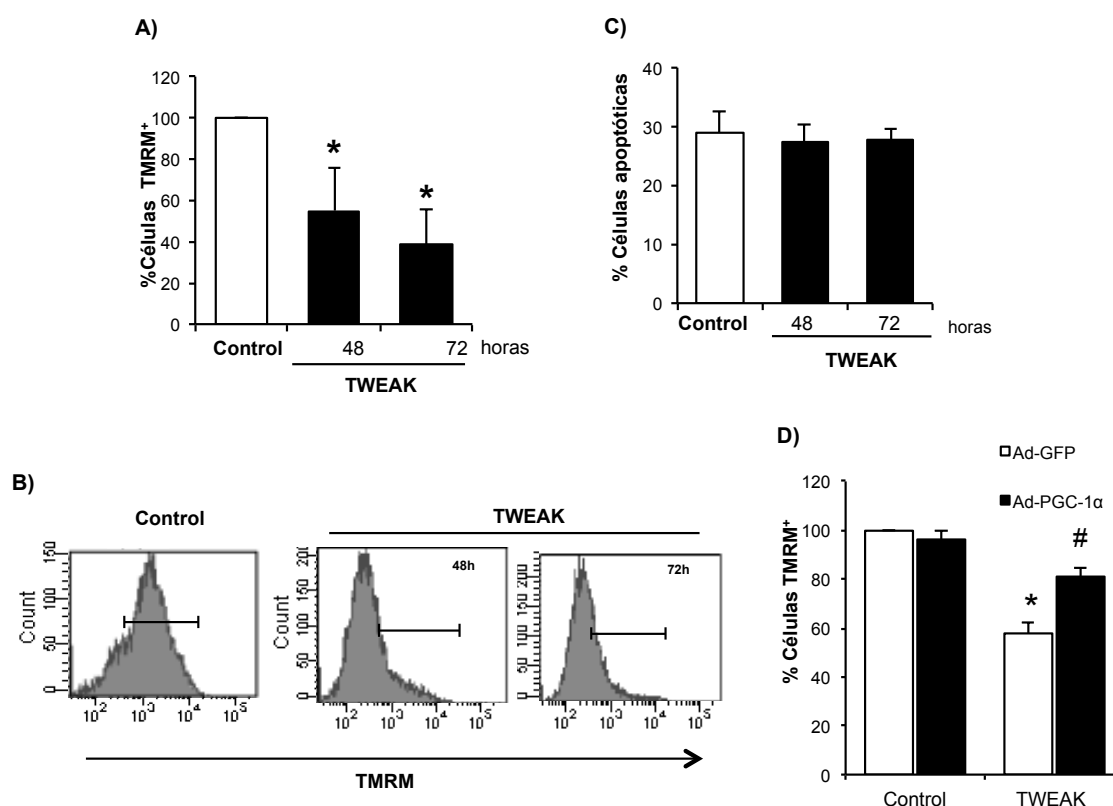


Figura 33. TWEAK disminuye el potencial de membrana mitocondrial (MMP) en células tubulares a través de la disminución de PGC-1 α . **A)** Las células tubulares se incubaron con 100 ng/ml de TWEAK durante 48 y 72 horas. Las células se tiñeron con TMRM y el MMP se analizó por citometría. Media \pm error de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control. **B)** Histograma representativo de la tinción TMRM en células estimuladas con TWEAK. **C)** La incubación durante 48 y 72 horas con 100 ng/ml de TWEAK no produce muerte celular por apoptosis. Las células fueron permeabilizadas y teñidas con yoduro de propidio para valorar las células hipodiploides, que se consideraron apoptóticas, mediante citometría de flujo de contenido celular de DNA. Media \pm error de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control. **D)** La sobreexpresión de PGC-1 α evita la disminución del MMP (tinción TMRM) en células tubulares tratadas con TWEAK. Media \pm error de 3 experimentos independientes. * $p < 0,003$ vs control, # $p < 0.05$ vs TWEAK-Ad-GFP.

12. La disminución de PGC-1 α inducida por TWEAK está mediada por NF κ B

Seguidamente, se estudió el mecanismo por el cual TWEAK induce la disminución de PGC-1 α . En células tubulares TWEAK activa la vía canónica de NF κ B, la cual media múltiples efectos producidos por TWEAK tales como el aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias y la disminución de la expresión de la proteína antienviejecimiento Klotho (Moreno et al., 2011, Sanz et al., 2008). En este trabajo se confirmó la activación de la vía canónica de NF κ B por parte de TWEAK demostrando la translocación nuclear de RelA (Figura 34).

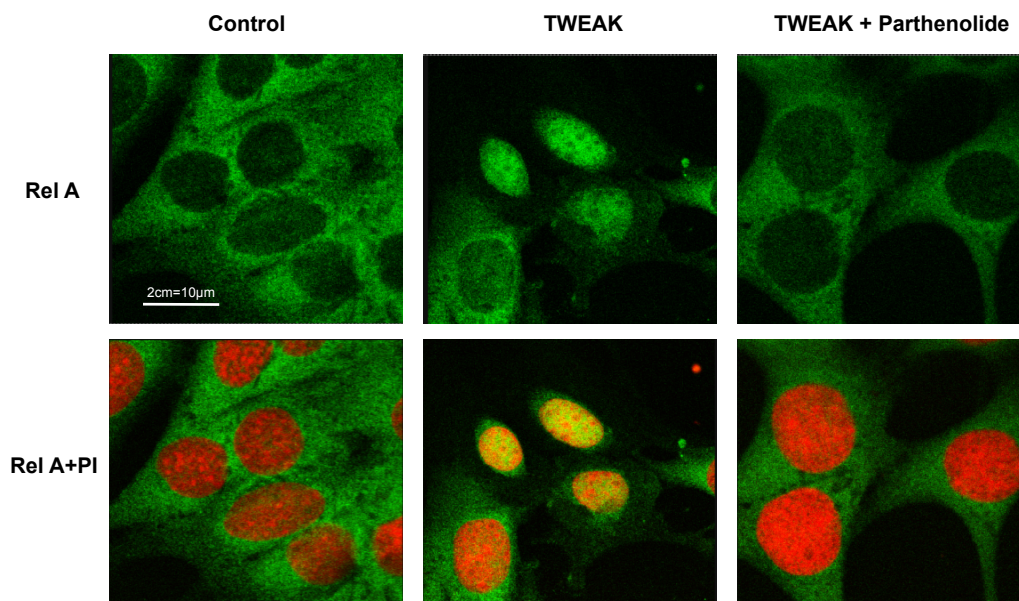


Figura 34. El parthenolide inhibe la activación de NFκB inducida por TWEAK. Las células tubulares se pretrataron con parthenolide durante 1 hora antes de estimular con 100 ng/ml de TWEAK durante 30 minutos. El parthenolide evitó la translocación nuclear de RelA inducida por TWEAK. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Microscopía confocal de RelA (verde) y yoduro de propidio (naranja). Aumento original X320. Barra de escala, 5 μm.

A este respecto, el inhibidor de la vía canónica de NFκB parthenolide (Hehner et al., 1999) evita por completo la translocación nuclear de RelA (**Figura 34**) y la expresión de genes dependiente de NFκB tales como MCP-1 (**Figura 35**) (Sanz et al., 2010a, Sanz et al., 2008) y la disminución de PGC-1α inducida por TWEAK a nivel de ARNm y de proteína (**Figs 36.A y B**), sugiriendo de este modo que la disminución de PGC-1α inducida por TWEAK está mediada por la activación de NFκB. Además, TWEAK induce la unión de RelA al promotor de PGC-1α como se comprobó mediante experimentos de ChIP (**Figura 36.C**).

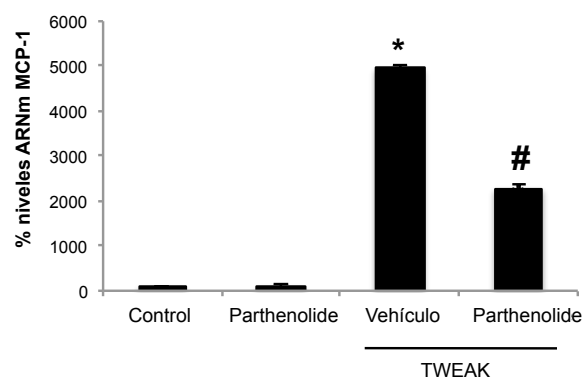


Figura 35. NFκB media el aumento de MCP-1 inducido por TWEAK. El inhibidor de NFκB parthenolide (10 μM) evita el aumento de MCP-1 inducido por TWEAK en células tubulares en

cultivo a las 6 horas a nivel a ARNm (qRT-PCR). Media±error de 3 experimentos independientes *p<0,05 vs control, # p<0,05 vs vehículo.

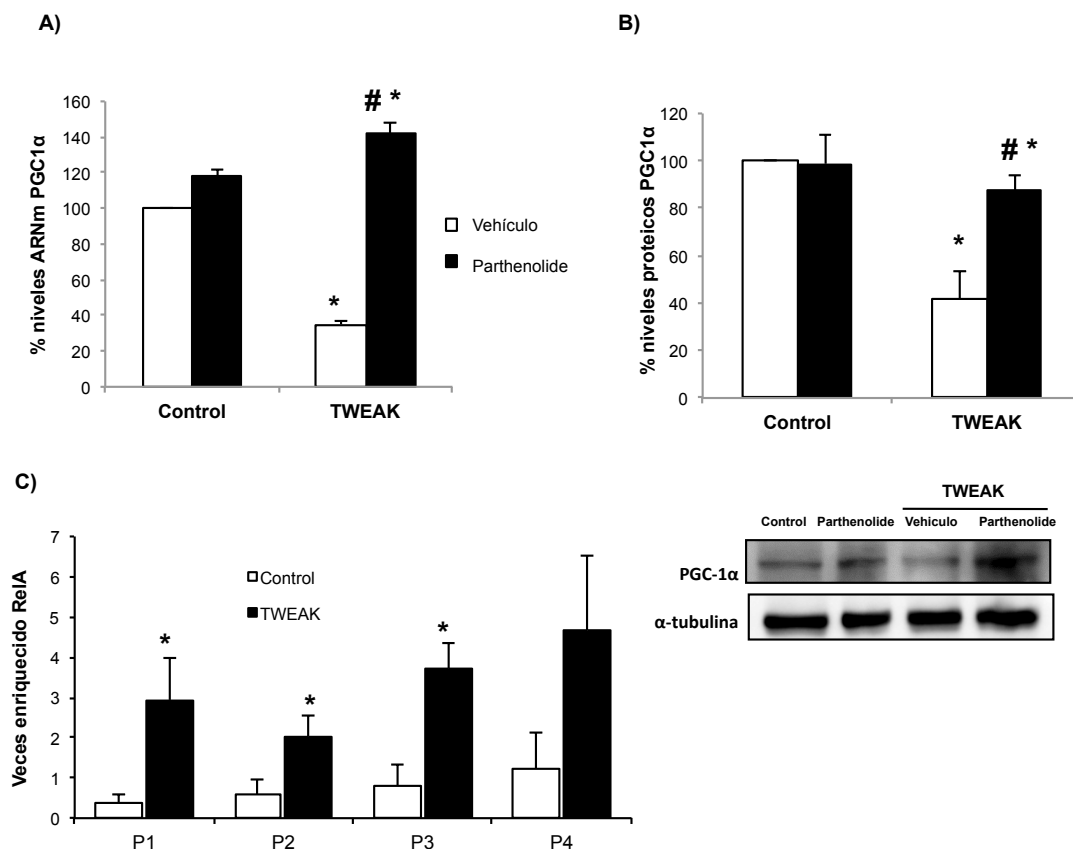


Figura 36. La disminución de PGC-1α inducida por TWEAK está medida por NFκB. A, **B)** El inhibidor de NFκB Parthenolide (10 μM) evita la disminución de ARNm de PGC-1α inducida por TWEAK en células en cultivo a las 6 horas (qRT.PCR) (A) y de proteína (Western blot) (B). Media±error de 3 experimentos independientes. *p<0,05 vs control #p<0,05 vs TWEAK solo. C) Las células tubulares fueron estimuladas con TWEAK a 6 horas y se llevó a cabo análisis de ChIP usando el anticuerpo anti-NFκB p65 (RelA). El número de copias del promotor se cuantificó por qRT-PCR por duplicado, usando cuatro primers (P1-P4) específicos para la amplificación de cuatro zonas diferentes de unión de NFκB del promotor de PGC-1α. Se usó IgG normal de conejo como control negativo para la especificidad de la inmunoprecipitación (IP). Como control positivo se usaron alícuotas de fragmentos de cromatina obtenidos antes de la inmunoprecipitación, y se sometieron también al análisis por qRT-PCR (Input). El ADN inmunoprecipitado con RelA se normalizó frente a una dilución 1/100 de la cromatina input. Los datos están expresados como número de veces que está enriquecida la unión de RelA en comparación con el control negativo (IgG de conejo). Media±error de 3 experimentos independientes.

13. TWEAK regula la expresión de PGC-1α mediante mecanismos epigenéticos

La acetilación/deacetilación de histonas juega un papel clave en la regulación de la expresión génica. De hecho, la deacetilación de histonas llevada a cabo por las HDAC es necesaria para la represión de la expresión del gen Klotho dependiente de p65/RelA, inducida por TWEAK en las células tubulares renales (Moreno et al., 2011). A este respecto, el pre-

tratamiento de células tubulares con inhibidores de HDAC, tricostatina A (TSA) o ácido valproico (VPA), evitan la disminución de PGC-1 α inducida por TWEAK tanto a nivel de ARNm como de proteína (**Figura 37.A y B**). Ensayos de ChIP utilizando anticuerpos frente a histonas acetiladas confirmaron que TWEAK produce la deacetilación de la histona H3 en los sitios de unión de NF κ B en el promotor de PGC-1 α murino en células tubulares renales, y un pre-tratamiento con TSA lo evita (**Figura 37.C**).

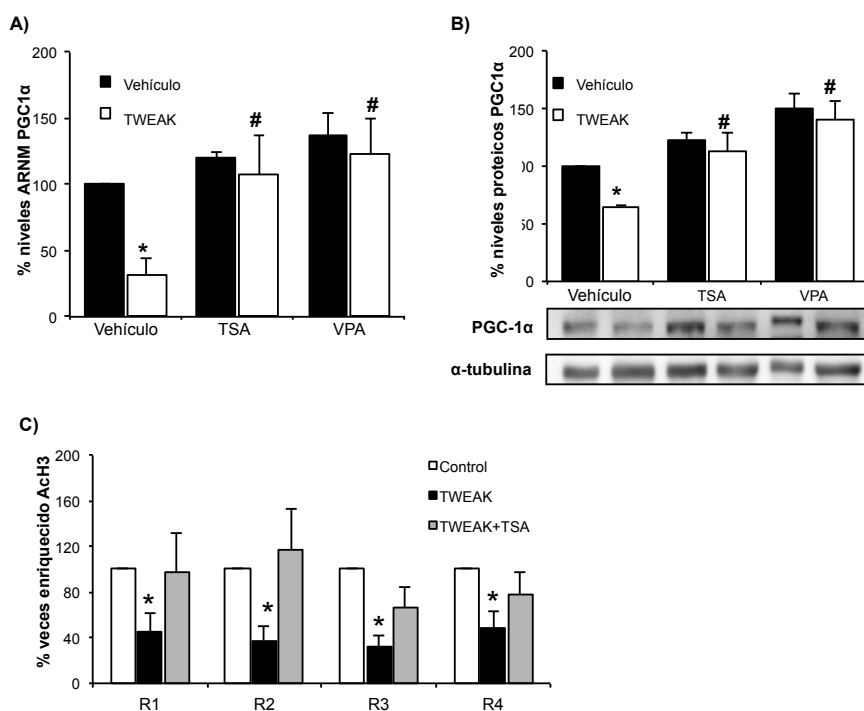


Figura 37. La disminución de PGC-1 α inducida por TWEAK requiere de la actividad de HDAC. Los inhibidores de HDAC tricostatina A (TSA) y ácido valproico (VPA) evitan la disminución de PGC-1 α en células tubulares estimuladas con TWEAK a 6 horas. Las células fueron previamente estimuladas con TSA (1,5 ng/ml) o VPA (500 μ M) 1 hora antes de añadir TWEAK. **A)** Los niveles de ARNm de PGC-1 α se estudiaron por qRT-PCR. Media \pm error de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control, # $p < 0,05$ vs TWEAK solo. **B)** Western blot representativo y cuantificación de 3 experimentos independientes de la expresión de PGC-1 α en células tratadas con inhibidores de HDAC y TWEAK. * $p < 0,04$ vs control; # $p < 0,05$ vs TWEAK solo. **C)** Las células tubulares se pretrataron con TSA (1.5 ng/ml) durante 1 hora y posteriormente fueron estimuladas con TWEAK durante 6 horas. Tras esto se realizó el análisis de ChIP usando el anticuerpo *anti-acetylated histone H3* (AcH3). El número de copias del promotor se cuantificó por qRT-PCR por duplicado, usando cuatro primers (R1-R4) específicos para la amplificación de cuatro zonas diferentes de unión de NF κ B del promotor de PGC-1 α . Se usó IgG normal de conejo como control negativo para la especificidad de la inmunoprecipitación (IP). Como control positivo se usaron alicuotas de fragmentos de cromatina obtenidos antes de la inmunoprecipitación, y se sometieron también al análisis por qRT-PCR (Input). El ADN inmunoprecipitado con AcH3 se normalizó frente a una dilución 1/100 de la cromatina input. Los datos están expresados como número de veces que está enriquecida la unión de AcH3 en comparación con el control negativo (IgG de conejo). Media \pm error de 3 experimentos independientes.

V. DISCUSIÓN

Aproximadamente el 5% de la población española padece algún grado de insuficiencia renal y el 11% tiene una enfermedad renal crónica (ERC). Esto se traduce en unos 51000 españoles que requieren sustitución de la función renal, consumiendo esto el 5% del gasto sanitario. El tratamiento actual de la patología renal es insatisfactorio ya que no existe un tratamiento adecuado que disminuya la gravedad ni acelere la recuperación del fracaso renal agudo (FRA).

El FRA no es un evento aislado, sino que a través de un mecanismo inflamatorio que implica la migración de neutrófilos, la expresión de citoquinas y el aumento del estrés oxidativo da lugar a la disfunción de múltiples órganos tales como el corazón, los pulmones, el hígado, los intestinos y el cerebro (Yilmaz et al., 2009). Además el FRA contribuye a la progresión de la ERC y la ERC predispone al FRA.

Por ello, es necesario desarrollar terapias que puedan modular o frenar el desarrollo de esta enfermedad. Nuestro objetivo en esta tesis ha sido identificar nuevos mediadores de daño renal y nuevos marcadores potenciales de lesión, mediante técnicas de alto rendimiento como la transcriptómica o genómica, y así poder avanzar hacia un mejor tratamiento de la patología renal.

1. LA CROTONILACIÓN DE HISTONAS EN EL RIÑÓN Y SU POSIBLE CONTRIBUCIÓN EN EL FRACASO RENAL AGUDO

Previamente a este estudio, habíamos identificado nuevas vías funcionales que relacionan entre sí nuevas moléculas identificadas mediante transcriptómica renal y que contribuyen a la patogenia de la nefropatía diabética, pero nunca antes habían sido relacionadas con el daño renal.

En concreto para esta tesis nos hemos centrado en el estudio de una nueva modificación de histonas descrita recientemente, la crotonilación de lisinas, que puede afectar a la expresión de determinados genes. En base a los antecedentes que teníamos hipotetizamos que la crotonilación de histonas podría jugar un papel en el daño renal y nos planteamos como objetivos estudiar la crotonilación de histonas en modelos celulares y animales de daño renal, así como el estudio de la expresión de genes cuyas histonas están crotoniladas.

Las histonas son las proteínas crotoniladas más abundantes. El hecho de haber encontrado un aumento de la crotonilación de histonas bajo condiciones de estrés, ya sea este el FRA o la exposición a una citoquina proinflamatoria como TWEAK, hace que nos preguntemos cuál podría ser el papel general de la crotonilación en el daño renal. Como en el caso de otros tipos de modificaciones postraduccionales, es de esperar que en respuesta al microambiente, algunos genes aumenten y otros disminuyan el grado de crotonilación de histonas. A pesar de esta heterogeneidad esperada, agentes terapéuticos dirigidos frente a otras modificaciones postraduccionales de histonas han sido beneficiosos en diversas condiciones patológicas,

incluyendo el daño renal, incluso cuando impactaban potencialmente la expresión de múltiples genes con funciones diversas o incluso opuestas. Por ejemplo, los inhibidores de deacetilasas de histonas (HDAC) tales como tricostatina A (TSA) fueron protectores en modelos experimentales de fibrosis renal (Van Beneden et al., 2013) y selectivamente mitigaron el efecto del lipopolisacárido (LPS) o la expresión de citoquinas inflamatorias (Munro et al., 2013).

La hipótesis de partida para esta tesis fue que la alteración de los niveles de crotonilación de histonas podrían tener un efecto, beneficioso o perjudicial, en el FRA. Hemos comprobado que el aumento de los niveles de crotonilación de histonas mediante exposición a crotonato, tiene efectos potencialmente beneficiosos sobre células tubulares en cultivo e *in vivo*, incluyendo un aumento en la expresión del regulador de biogénesis mitocondrial PGC-1 α y una disminución en la expresión de quimioquinas. Consistente con estos resultados, hemos observado que el crotonato protege del daño y pérdida de función renal en el FRA. Los genes estudiados en la presente tesis fueron elegidos como representativos de los genes regulados al alza, comunes al FRA y al cultivo de células tubulares estimuladas con TWEAK. Sabemos que las modificaciones postraduccionales de histonas pueden afectar a la expresión de múltiples genes, por lo que aún faltaría por explorar si los cambios en la expresión de esos genes específicos o de otros genes, son los principales responsables de los efectos beneficiosos que hemos visto que produce el crotonato.

En esta tesis hemos identificado y caracterizado dos estrategias que aumentan la crotonilación total de histonas en células renales: estresar las células con citoquinas inflamatorias o durante el FRA, y aumentar la disponibilidad del sustrato, el crotonato. Por otro lado, hemos comprobado que la citotoxicidad directa producida por cisplatino no modula la crotonilación de histonas *in vitro*. No obstante, las dos estrategias identificadas tienen un efecto diferente sobre la expresión de los genes estudiados. Es así que hemos identificado dos genes específicos, PGC-1 α y SIRT3, que sufren un aumento de crotonilación de histonas durante el FRA y en células tubulares estimuladas con TWEAK. Bajo condiciones de estrés, los niveles de ARNm y proteína de ambos genes están disminuidos, lo que sugiere una disminución de la transcripción. Una posible explicación de esto podría ser que el aumento de los niveles de crotonilación de histonas produce la disminución de la transcripción génica. Pero hemos comprobado que añadiendo crotonato, y aumentando por lo tanto la crotonilación total de histonas, aumenta la expresión de los genes PGC-1 α y SIRT3. Por ello, es necesario considerar una explicación alternativa. Una posibilidad es que el efecto de la crotonilación de histonas sea dependiente del contexto, es decir, con el aumento de la disponibilidad del sustrato (el crotonato) la crotonilación de histonas promueve la expresión génica; mientras que bajo un ambiente proinflamatorio o de estrés celular, la crotonilación de histonas disminuye la expresión de ciertos genes. A este respecto, la misma modificación postraduccional de histonas estará asociada con aumento o disminución de la expresión génica dependiendo del gen y de las

condiciones del medio que le rodea (Bao et al., 2014, Sabari et al., 2015). Dado esto, será necesario llevar a cabo más estudios para clarificar este asunto para el caso concreto de la crotonilación. Hasta el momento, se ha descrito que niveles altos de crotonilación de histonas en los promotores de genes activados por LPS, tales como *Il6*, *Gbp2*, *Ifit2*, y *Rsad2*, están asociados con un aumento de la expresión génica (Sabari et al., 2015). A este respecto, una posible explicación alternativa es que el aumento de la crotonilación de histonas tras el estrés celular que se da en los genes que codifican para *SIRT3* y *PGC-1 α* , pueda ser un mecanismo de compensación que limite la caída en la expresión génica más que llevar a cabo la supresión génica. Aun así, se necesitan más estudios para descifrar el papel de la crotonilación de histonas en la regulación de la expresión génica en diferentes contextos celulares y para genes específicos.

Recientemente se ha descrito que el crotonato aumenta la disponibilidad intracelular de crotonil-CoA, así se estimula la transcripción génica a través de crotonilación de histonas catalizada por p300 (Sabari et al., 2015). A este respecto, la crotonilación de histonas puede ser catalizada por p300 o por el complejo p300/CBP (*acetyltransferase p300/CREB-binding protein*) (Sabari et al., 2015). Curiosamente, *SIRT3* y *PGC-1 α* se regulan mutuamente a través de mecanismos mediados por CREB (Shi et al., 2005, Palacios et al., 2009, Than et al., 2011, Giralt et al., 2011). Nuestros resultados sugieren que el crotonato, mediante el aumento del crotonil-CoA disponible, conduce a niveles aumentados de crotonilación de histonas (Sabari et al., 2015), y al aumento de la transcripción de *SIRT3*, que actúa como decrotonilasa. El aumento de expresión de decrotonilasas en respuesta al crotonato sería interpretado como un mecanismo de retroalimentación negativa. Los niveles aumentados de *SIRT3* y de crotonilación de histonas aumentarían los niveles de *PGC-1 α* limitando así el daño celular producido como respuesta al estrés.

Por el contrario, bajo condiciones de estrés tales como el FRA o en células tubulares estresadas por citoquinas inflamatorias (ej. TWEAK), la disminución de la expresión de *SIRT3*, y potencialmente, de la actividad decrotonilasa de *SIRT3*, nos llevaría a un aumento de la crotonilación de histonas, limitando de este modo la disminución de genes protectores tales como *PGC-1 α* (**Figura 38**). De esta manera, una menor expresión de *SIRT3* sería una vía adicional para el aumento de la crotonilación de histonas en un ambiente inflamatorio. No obstante, en el futuro deberán llevarse a cabo estudios para explorar los cambios en la crotonilación de histonas en relación con el estado funcional de la célula, así como para identificar cambios en la crotonilación de histonas en genes individuales.

SIRT3 es la deacetilasa que fisiológicamente antagoniza la acetilación de histonas mediada por p300 (Wang et al., 2012). Aunque las sirtuinas fueron inicialmente descritas como deacetilasas NAD dependientes (Imai et al., 2000, Landry et al., 2000, Sauve et al., 2006), algunas sirtuinas con actividad deacetilasa más débil tienen una especificidad de sustrato por

otros grupos acilo unidos a los residuos lisina. Por ejemplo, SIRT5 hidroliza preferentemente los grupos malonil y succinil de las lisinas (Jiang et al., 2013, Du et al., 2011, Peng et al., 2011), y SIRT6 puede eliminar grupos acilo de los residuos lisina de los ácidos grasos de cadena larga (Jiang et al., 2013). Más recientemente se ha descrito que SIRT1, SIRT2 y SIRT3 se comportan también como decrotonilasas, regulando así la dinámica de la crotonilación de histonas y la transcripción génica, aunque solo SIRT3 lo haría dentro de la célula (Bao et al., 2014).

También hemos observado un patrón de tinción compatible con la crotonilación de histonas en tejido renal humano, incluyendo riñones enfermos. A pesar de que no pudimos estudiar estadios tempranos de FRA en humanos, ya que normalmente los pacientes con FRA no se biopsian, esta observación apoya la relevancia del potencial clínico de nuestros hallazgos.

Como resumen de esta primera parte, nuestros resultados muestran por primera vez que el patrón de crotonilación de histonas cambia durante el FRA y en células tubulares en cultivo estresadas con una citoquina inflamatoria, lo que sugiere que la crotonilación de histonas juega un papel en el daño renal. Además, el grado de crotonilación de histonas en el riñón puede ser terapéuticamente manipulado mediante la administración de crotonato, y un aumento general de la crotonilación de histonas es nefroprotector. Si bien los mecanismos precisos del efecto protector del crotonato aún no se conocen bien, nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que la regulación de la transcripción génica mediada por la crotonilación de histonas juega un papel importante en el daño renal. Esta es la primera observación *in vivo* del potencial terapéutico de la manipulación de la crotonilación de histonas en un estado de enfermedad. A la vista de los resultados obtenidos en esta tesis, serán necesarios más estudios en otros modelos de enfermedad renal y en otros tejidos con daño para definir detalladamente el papel de la crotonilación de histonas.

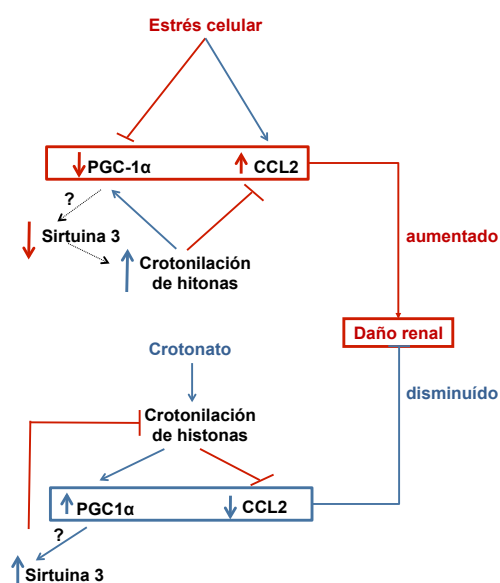


Figura 38. Esquema de la hipótesis del mecanismo y consecuencias de la crotonilación de histonas en el daño renal.

2. TWEAK DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE PGC-1 α Y EMPEORA LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL FRACASO RENAL AGUDO

La disminución de PGC-1 α es un elemento causal de la disfunción renal que se produce durante la sepsis asociada al FRA (Stallons et al., 2014); y tal y como se acaba de describir en esta tesis, el aumento de la crotonilación de histonas aumenta la expresión de PGC-1 α en células tubulares en cultivo e *in vivo*. Además SIRT3 y PGC-1 α se regulan mutuamente (Shi et al., 2005, Palacios et al., 2009, Than et al., 2011, Giralt et al., 2011).

Mediante transcriptómica habíamos identificamos previamente que la expresión de PGC-1 α y genes dependientes de PGC-1 α que codifican para proteínas mitocondriales (Ndufs1, Sdha y Tfam) están disminuidos en el FRA y en células tubulares de riñón estimuladas con TWEAK. Basándonos en esto, decidimos explorar la interacción entre inflamación y reguladores de la biogénesis mitocondrial.

PGC-1 α es un coactivador transcripcional que se expresa en tejidos ricos en mitocondrias con altos requerimientos de energía tales como el hígado, tejido adiposo, páncreas, músculo, riñón y cerebro (Besseiche et al., 2015). PGC-1 α regula la biogénesis mitocondrial y está relacionado con los factores respiratorios nucleares (NRFs) y el factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) para promover la transcripción de genes que codifican proteínas mitocondriales y llevan a cabo la biogénesis mitocondrial (Medvedeva et al., 2015, Wu et al., 1999, Finck and Kelly, 2006). Estudios de sobreexpresión o pérdida de función de PGC-1 α respaldan un papel de PGC-1 α en enfermedades tales como el fallo cardíaco o la atrofia muscular esquelética (Vainshtein et al., 2015, Arany et al., 2005, Russell et al., 2004). Además, existen evidencias de un papel protector de PGC-1 α en la enfermedad renal ya que:

- a) los riñones y células de túbulo proximal son ricos en mitocondrias y los cambios mitocondriales son característicos del FRA
- b) los niveles de PGC-1 α renales están disminuidos en diferentes modelos de FRA
- c) la sobreexpresión o activación de PGC-1 α mejoran la función renal (Tábara et al., 2014, Stallons et al., 2014, Tran et al., 2011, Funk and Schnellmann, 2012, Funk and Schnellmann, 2013).

En efecto, nosotros hemos observado que la disminución de PGC-1 α durante el FRA correlaciona con la gravedad del fallo renal, y está asociada con una expresión reducida de los genes diana de PGC-1 α codificantes para proteínas mitocondriales. Curiosamente, la expresión de Fn14, receptor de TWEAK, correlaciona negativamente con la expresión de PGC-1 α , lo que sugiere una relación entre la disminución de los niveles de PGC-1 α y la activación de TWEAK/Fn14 en el FRA. El aumento de la expresión de Fn14 es la principal vía que conduce a un aumento de la actividad del sistema TWEAK/Fn14, y la actuación sobre TWEAK/Fn14 protege de diversos factores característicos del FRA tales como la inflamación, muerte celular y

disfunción renal; en varios modelos experimentales de FRA (Sanz et al., 2008, Hotta et al., 2011, Sanz et al., 2010b, Sanz et al., 2010a, Sanz et al., 2009).

TWEAK media la disminución de PGC-1 α durante el FRA, y reduce los niveles de PGC-1 α en las células renales tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos datos son consistentes con hallazgos previos que mostraban que TWEAK disminuye los niveles de PGC-1 α en enfermedades tales como el fallo cardíaco y la atrofia muscular esquelética (Shi et al., 2013, Hindi et al., 2014).

La curva de tiempo de la disminución de los niveles de PGC-1 α mediada por TWEAK muestra que este descenso es de alguna forma más rápido en células en cultivo estimuladas con TWEAK que en riñón tras la administración de TWEAK *in vivo*. Hay varias explicaciones posibles para esta discrepancia, incluyendo las diferencias en el tiempo de latencia desde la administración de TWEAK hasta la exposición de las células a la citoquina, y la complejidad del medio *in vivo* en términos de múltiples tipos celulares y arquitectura tisular entre otros. Sin embargo, este retraso en la respuesta de PGC-1 α renal frente a la estimulación *in vivo* con TWEAK en ratones sanos es consistente tanto con los datos de FRA como con los limitados resultados que hay en otros tipos celulares y en otros tejidos (Hindi et al., 2014). En consecuencia, en el FRA a tiempos cortos (24h) tanto la disminución de PGC-1 α como la disfunción renal son independientes de TWEAK y probablemente sean una consecuencia del insulto inicial, a pesar del aumento de TWEAK y Fn14. Por el contrario, a tiempos más tardíos (72h) tanto el fallo renal como la disminución de PGC-1 α son dependientes de TWEAK. Una discrepancia similar en la curva de tiempo entre células en cultivo e *in vivo* ha sido observada en músculo esquelético, donde TWEAK disminuye los niveles de ARNm de PGC-1 α a las 24h en miotubos en cultivo (Hindi et al., 2014). Sin embargo, tras denervación *in vivo*, a pesar del aumento inicial de la expresión de Fn14, el descenso inicial en el ARNm de PGC-1 α es dependiente de TWEAK, pero el posterior descenso (en este caso a los 10 días) de los niveles de PGC-1 α es independiente de TWEAK (Hindi et al., 2014). A este respecto, TWEAK induce la activación de NF κ B (Sanz et al., 2011).

La relevancia fisiológica de la disminución de PGC-1 α inducida por TWEAK está apoyada por el hecho de que TWEAK también disminuye la expresión de genes que codifican proteínas mitocondriales y conduce a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (MMP). Esto encaja con la hipótesis de que la disminución de PGC-1 α contribuye a la disfunción renal mediada por TWEAK. Lo que es más, si sobreexpresamos PGC-1 α se previene la disminución de genes dependientes de PGC-1 α inducida por TWEAK en células en cultivo. Entre los genes que codifican para proteínas mitocondriales disminuidos en el FRA *in vivo* y en células tratadas con TWEAK encontramos Ndufs1, Sdha y Tfam, que codifican para la *NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1* (NDUFS1), *succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)* (SDHA), y *mitochondrial transcription factor A* (TFAM),

respectivamente. NDUF51 es un componente del complejo I de la cadena respiratoria, y las mutaciones en este gen causan enfermedades neurológicas (Dieteren et al., 2012, Petruzzella et al., 2012). SDHA es la principal subunidad catalítica del complejo II de la mitocondria y es también un componente de los canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP (Hoekstra and Bayley, 2013). TFAM es un factor de transcripción mitocondrial clave para la regulación de la replicación y reparación del ADN mitocondrial (Kaufman et al., 2007).

TWEAK es un miembro de la superfamilia del TNF. La neutralización de anticuerpos anti-TNF α está aprobado para la práctica clínica frente a una variedad de condiciones inflamatorias (Kalunian and Merrill, 2009). Mientras que las acciones de TNF α en células renales han sido ampliamente caracterizadas, y continúan estudiándose, mucho menos se sabe acerca de las acciones de TWEAK en las células renales. Aunque en realidad, algunas diferencias básicas ya se conocen. De este modo sabemos que TNF produce muerte en células tubulares de riñón no estresadas (Ortiz et al., 2000), mientras que TWEAK produce proliferación (Sanz et al., 2009). TNF produce la activación transitoria de la vía canónica de NF κ B y la expresión de quimioquinas mientras que TWEAK produce la activación de la vía canónica y la no-canónica de NF κ B con la secreción de un set diferente, más amplio, de quimioquinas (Sanz et al., 2010a). La neutralización de TWEAK con anticuerpos anti-TWEAK ha sido llevada a ensayo clínico en nefritis lúpica (Medvedeva et al., 2015). Dado la potencial futura disponibilidad de estrategias dirigidas contra TWEAK, vale la pena discernir las diferentes vías de activación de TWEAK en el marco del daño renal. Hemos comprobado que TWEAK disminuye el potencial de membrana mitocondrial sin inducir muerte celular. No obstante, es sabido que TWEAK produce muerte celular en conjunto con otros estímulos tales como un ambiente proinflamatorio (Justo et al., 2006) o toxinas urémicas (Poveda et al., 2014). La disminución de PGC-1 α y la disfunción mitocondrial inducida por TWEAK podría contribuir a la sensibilización frente a la letalidad de otros estímulos.

Es bien conocido que las vías de TWEAK y NF κ B son activadores de la respuesta inflamatoria. Además, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que podrían producir daño renal en conjunto con la deacetilación de histonas mediante la disminución en la expresión de factores de protección celular como PGC-1 α , tal y como se describió ya previamente con Klotho (Moreno et al., 2011), el cual previene la senectud inducida por estrés y tiene funciones antiinflamatorias y antifibróticas (Zhou et al., 2013). La deacetilación de histonas juega un papel clave en la disminución de la expresión de PGC-1 α . Este efecto parece ser dependiente de la deacetilación de histonas en los sitios de unión de NF κ B en el locus del promotor de PPARGC1A, ya que RelA se une a los mismos sitios. Dos inhibidores de HDAC produjeron resultados similares y confirmamos el aumento de la acetilación de histonas por TSA. Además, la inhibición de NF κ B con parthenolide ha sido caracterizada con detalle en este sistema celular (Izquierdo et al., 2012, Sanz et al., 2008). A este respecto, el traslado a la clínica de estas

observaciones vendría en forma de pequeñas moléculas inhibitoras. Así, los inhibidores de HDAC están ya en uso clínico pero tienen muchos genes diana de potencial interés. Un mejor entendimiento del rango de dianas ayudaría enormemente a refinar esta aproximación terapéutica.

Nuestra hipótesis sobre el mecanismo por el cual TWEAK induce la disminución de PGC-1 α se resume en la **Figura 39**. Basándonos en los resultados y en lo que hasta hoy se sabe del sistema NF κ B, hemos hipotetizado que la unión de NF κ B RelA al promotor de PGC-1 α reclutaría proteínas correpresoras de HDAC que producirían la deacetilación de histonas y la condensación de la cromatina, lo que haría disminuir la expresión génica. Se sabe desde hace tiempo que la función transactivadora de NF κ B está regulada en parte por la asociación de NF κ B RelA con proteínas correpresoras de HDAC (Ashburner et al., 2001). Sin embargo, en los últimos años se han descrito varios ejemplos de supresión génica mediada por NF κ B a través del reclutamiento de HDAC por parte de RelA con la subsecuente disminución en la acetilación de histonas y la represión de la expresión génica (Wang et al., 2013, Liu and Khachigian, 2009, Bhat et al., 2008). Estos incluyen la disminución de la expresión de TRPC6 en células mesangiales inducida por especies reactivas de oxígeno, represión de PDGF-D por IL-1 β en células de músculo liso (Liu and Khachigian, 2009), supresión de Klotho por TEWAK/TNF α en células renales (Moreno et al., 2011), y la supresión de YKL-40 inducida por TNF α en células de glioma (Bhat et al., 2008).

Como resumen de esta segunda parte, el presente trabajo sugiere que la vía de señalización TWEAK-Fn14 disminuye la expresión de PGC-1 α durante el FRA a través de la vía canónica de NF κ B y mecanismo epigenéticos tales como la deacetilación de histonas en los sitios de unión de NF κ B. Estos resultados podrían tener importante relevancia para el diseño de aproximaciones terapéuticas que aumenten la expresión de PGC-1 α durante el daño renal.

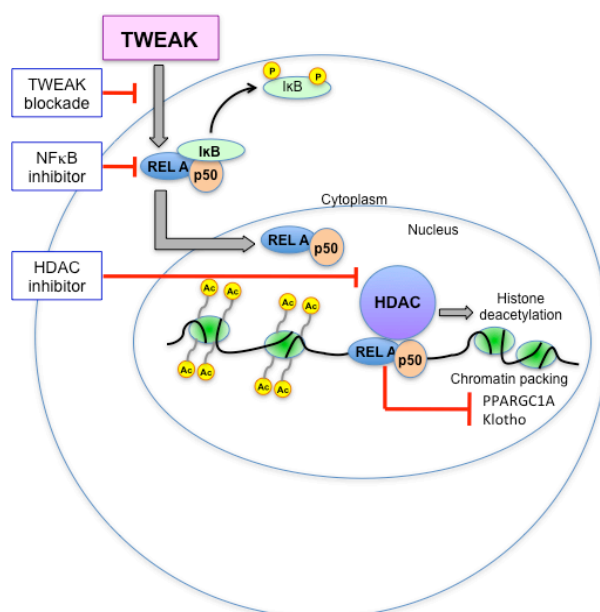


Figura 39. Resumen de nuestra hipótesis sobre el mecanismo por el cual TWEAK induce la disminución de PGC-1 α y de otras moléculas nefroprotectoras como Klotho.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El grado de crotonilación de histonas en células tubulares del riñón se modifica con ciertos estímulos estresantes (ej. TWEAK) y con crotonato.
2. El aumento de la crotonilación de histonas es beneficioso en el FRA. Esta es la primera observación del potencial terapéutico *in vivo* de la manipulación de la crotonilación de histonas en una enfermedad.
3. Los niveles de expresión de PGC-1 α y de sus genes dianas que codifican para proteínas mitocondriales están disminuidos en el FRA *in vivo* y esto es dependiente de la citoquina TWEAK.
4. TWEAK también reduce la expresión de los genes diana de PGC-1 α (Ndufs1, Sdha y Tfam) en células tubulares en cultivo a través de la activación de NF κ B y de la deacetilación de histonas, lo que causa disfunción mitocondrial.
5. Estos conocimientos pueden facilitar el desarrollo de nuevos tratamientos para la enfermedad renal

CONCLUSIONS

1. Kidney histones crotonylation levels in tubular cells change with under stress conditions (eg. TWEAK) and with crotonate.
2. Increasing histone crotonylation was overall beneficial in AKI. This is the first observation of the *in vivo* potential of the therapeutic manipulation of histone crotonylation in a disease state.
3. PGC-1 α and its targets genes encoding mitochondrial proteins are downregulated in AKI *in vivo* and this is dependent on the cytokine TWEAK.
4. TWEAK also reduces the expression of PGC-1 α target genes (Ndufs1, Sdha y Tfam) in cultured tubular cells through NF κ B activation and histone deacetylation, resulting in impaired mitochondrial function.
5. These results may be relevant to design new therapeutic approaches to kidney disease

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V. and Harkins, R. N. (1985) 'Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization', *J Biol Chem*, 260(4), pp. 2345-54.
- Aquilano, K., Vigilanza, P., Baldelli, S., Pagliei, B., Rotilio, G. and Ciriolo, M. R. (2010) 'Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis', *J Biol Chem*, 285(28), pp. 21590-9.
- Arany, Z., He, H., Lin, J., Hoyer, K., Handschin, C., Toka, O., Ahmad, F., Matsui, T., Chin, S., Wu, P. H., Rybkin, I. I., Shelton, J. M., Manieri, M., Cinti, S., Schoen, F. J., Bassel-Duby, R., Rosenzweig, A., Ingwall, J. S. and Spiegelman, B. M. (2005) 'Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle', *Cell Metab*, 1(4), pp. 259-71.
- Ashburner, B. P., Westerheide, S. D. and Baldwin, A. S. (2001) 'The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression', *Mol Cell Biol*, 21(20), pp. 7065-77.
- Baek, J. H., Zeng, R., Weinmann-Menke, J., Valerius, M. T., Wada, Y., Ajay, A. K., Colonna, M. and Kelley, V. R. (2015) 'IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease', *J Clin Invest*, 125(8), pp. 3198-214.
- Ballestar, E. and Wolffe, A. P. (2001) 'Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression', *Eur J Biochem*, 268(1), pp. 1-6.
- Bao, X., Wang, Y., Li, X., Li, X. M., Liu, Z., Yang, T., Wong, C. F., Zhang, J., Hao, Q. and Li, X. D. (2014) 'Identification of 'erasers' for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach', *Elife*, 3.
- Bechtel, W., McGoohan, S., Zeisberg, E. M., Müller, G. A., Kalbacher, H., Salant, D. J., Müller, C. A., Kalluri, R. and Zeisberg, M. (2010) 'Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney', *Nat Med*, 16(5), pp. 544-50.
- Beckerman, P., Ko, Y. A. and Susztak, K. (2014) 'Epigenetics: a new way to look at kidney diseases', *Nephrol Dial Transplant*, 29(10), pp. 1821-7.
- Bell, E. L. and Guarente, L. (2011) 'The SirT3 divining rod points to oxidative stress', *Mol Cell*, 42(5), pp. 561-8.
- Bellizzi, D., Rose, G., Cavalcante, P., Covello, G., Dato, S., De Rango, F., Greco, V., Maggiolini, M., Feraco, E., Mari, V., Franceschi, C., Passarino, G. and De Benedictis, G. (2005) 'A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages', *Genomics*, 85(2), pp. 258-63.

- Benigni, A., Corna, D., Zoja, C., Sonzogni, A., Latini, R., Salio, M., Conti, S., Rottoli, D., Longaretti, L., Cassis, P., Morigi, M., Coffman, T. M. and Remuzzi, G. (2009) 'Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice', *J Clin Invest*, 119(3), pp. 524-30.
- Besseiche, A., Riveline, J. P., Gautier, J. F., Bréant, B. and Blondeau, B. (2015) 'Metabolic roles of PGC-1 α and its implications for type 2 diabetes', *Diabetes Metab*.
- Bhat, K. P., Pelloski, C. E., Zhang, Y., Kim, S. H., deLaCruz, C., Rehli, M. and Aldape, K. D. (2008) 'Selective repression of YKL-40 by NF-kappaB in glioma cell lines involves recruitment of histone deacetylase-1 and -2', *FEBS Lett*, 582(21-22), pp. 3193-200.
- Bodmer, J. L., Schneider, P. and Tschopp, J. (2002) 'The molecular architecture of the TNF superfamily', *Trends Biochem Sci*, 27(1), pp. 19-26.
- Bonizzi, G., Bebie, M., Otero, D. C., Johnson-Vroom, K. E., Cao, Y., Vu, D., Jegga, A. G., Aronow, B. J., Ghosh, G., Rickert, R. C. and Karin, M. (2004) 'Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers', *EMBO J*, 23(21), pp. 4202-10.
- Burkly, L. C., Michaelson, J. S., Hahm, K., Jakubowski, A. and Zheng, T. S. (2007) 'TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease', *Cytokine*, 40(1), pp. 1-16.
- Campbell, S., Burkly, L. C., Gao, H. X., Berman, J. W., Su, L., Browning, B., Zheng, T., Schiffer, L., Michaelson, J. S. and Putterman, C. (2006) 'Proinflammatory effects of TWEAK/Fn14 interactions in glomerular mesangial cells', *J Immunol*, 176(3), pp. 1889-98.
- Carrozza, M. J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S. K., Lee, K. K., Shia, W. J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M. P. and Workman, J. L. (2005) 'Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription', *Cell*, 123(4), pp. 581-92.
- Chen, C. J., Fu, Y. C., Yu, W. and Wang, W. (2013) 'SIRT3 protects cardiomyocytes from oxidative stress-mediated cell death by activating NF- κ B', *Biochem Biophys Res Commun*, 430(2), pp. 798-803.
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I. and Browning, J. L. (1997) 'TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis', *J Biol Chem*, 272(51), pp. 32401-10.
- Choi, J., Batchu, V. V., Schubert, M., Castellani, R. J. and Russell, J. W. (2013) 'A novel PGC-1 α isoform in brain localizes to mitochondria and associates with PINK1 and VDAC', *Biochem Biophys Res Commun*, 435(4), pp. 671-7.

- Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (2004) 'Histone deimination antagonizes arginine methylation', *Cell*, 118(5), pp. 545-53.
- de Haij, S., Woltman, A. M., Bakker, A. C., Daha, M. R. and van Kooten, C. (2002) 'Production of inflammatory mediators by renal epithelial cells is insensitive to glucocorticoids', *Br J Pharmacol*, 137(2), pp. 197-204.
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J. B., Lipovich, L., Gonzalez, J. M., Thomas, M., Davis, C. A., Shiekhata, R., Gingeras, T. R., Hubbard, T. J., Notredame, C., Harrow, J. and Guigó, R. (2012) 'The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression', *Genome Res*, 22(9), pp. 1775-89.
- Desplat-Jégo, S., Varriale, S., Creidy, R., Terra, R., Bernard, D., Khrestchatisky, M., Izui, S., Chicheportiche, Y. and Boucraut, J. (2002) 'TWEAK is expressed by glial cells, induces astrocyte proliferation and increases EAE severity', *J Neuroimmunol*, 133(1-2), pp. 116-23.
- Devaskar, S. U. and Raychaudhuri, S. (2007) 'Epigenetics--a science of heritable biological adaptation', *Pediatr Res*, 61(5 Pt 2), pp. 1R-4R.
- Dieteren, C. E., Koopman, W. J., Swarts, H. G., Peters, J. G., Maczuga, P., van Gemst, J. J., Masereeuw, R., Smeitink, J. A., Nijtmans, L. G. and Willems, P. H. (2012) 'Subunit-specific incorporation efficiency and kinetics in mitochondrial complex I homeostasis', *J Biol Chem*, 287(50), pp. 41851-60.
- Doi, K., Okamoto, K., Negishi, K., Suzuki, Y., Nakao, A., Fujita, T., Toda, A., Yokomizo, T., Kita, Y., Kihara, Y., Ishii, S., Shimizu, T. and Noiri, E. (2006) 'Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice', *Am J Pathol*, 168(5), pp. 1413-24.
- Donohue, P. J., Richards, C. M., Brown, S. A., Hanscom, H. N., Buschman, J., Thangada, S., Hla, T., Williams, M. S. and Winkles, J. A. (2003) 'TWEAK is an endothelial cell growth and chemotactic factor that also potentiates FGF-2 and VEGF-A mitogenic activity', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(4), pp. 594-600.
- Ernst, J. and Kellis, M. (2013) 'Interplay between chromatin state, regulator binding, and regulatory motifs in six human cell types', *Genome Res*, 23(7), pp. 1142-54.
- Finck, B. N. and Kelly, D. P. (2006) 'PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease', *J Clin Invest*, 116(3), pp. 615-22.

- Funk, J. A. and Schnellmann, R. G. (2012) 'Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury', *Am J Physiol Renal Physiol*, 302(7), pp. F853-64.
- Gao, H. X., Campbell, S. R., Burkly, L. C., Jakubowski, A., Jarchum, I., Banas, B., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Berman, J. W., Michaelson, J. S. and Putterman, C. (2009) 'TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) induces inflammatory and proliferative effects in human kidney cells', *Cytokine*, 46(1), pp. 24-35.
- Garcia-Cenador, M. B., Lorenzo-Gomez, M. F., Herrero-Payo, J. J., Ruiz, J., Perez de Obanos, M. P., Pascual, J., Lopez-Novoa, J. M. and Garcia-Criado, F. J. (2013) 'Cardiotrophin-1 administration protects from ischemia-reperfusion renal injury and inflammation', *Transplantation*, 96(12), pp. 1034-42.
- Giralt, A., Hondares, E., Villena, J. A., Ribas, F., Díaz-Delfín, J., Giralt, M., Iglesias, R. and Villarroya, F. (2011) 'Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype', *J Biol Chem*, 286(19), pp. 16958-66.
- González-Cuadrado, S., Bustos, C., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., Guijarro, C., Plaza, J. J. and Egido, J. (1996) 'Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis', *Clin Exp Immunol*, 106(3), pp. 518-22.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2008) 'Shared principles in NF-kappaB signaling', *Cell*, 132(3), pp. 344-62.
- Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Dröge, W. and Schmitz, M. L. (1999) 'The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex', *J Immunol*, 163(10), pp. 5617-23.
- Hindi, S. M., Mishra, V., Bhatnagar, S., Tajrishi, M. M., Ogura, Y., Yan, Z., Burkly, L. C., Zheng, T. S. and Kumar, A. (2014) 'Regulatory circuitry of TWEAK-Fn14 system and PGC-1α in skeletal muscle atrophy program', *FASEB J*, 28(3), pp. 1398-411.
- Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D. B., Grueter, C. A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O. R., Stevens, R. D., Li, Y., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Bain, J. R., Newgard, C. B., Farese, R. V., Alt, F. W., Kahn, C. R. and Verdin, E. (2010) 'SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation', *Nature*, 464(7285), pp. 121-5.
- Hoekstra, A. S. and Bayley, J. P. (2013) 'The role of complex II in disease', *Biochim Biophys Acta*, 1827(5), pp. 543-51.
- Hotta, K., Sho, M., Yamato, I., Shimada, K., Harada, H., Akahori, T., Nakamura, S., Konishi, N., Yagita, H., Nonomura, K. and Nakajima, Y. (2011) 'Direct targeting of

- fibroblast growth factor-inducible 14 protein protects against renal ischemia reperfusion injury', *Kidney Int*, 79(2), pp. 179-88.
- Huang, J. Y., Hirschey, M. D., Shimazu, T., Ho, L. and Verdin, E. (2010) 'Mitochondrial sirtuins', *Biochim Biophys Acta*, 1804(8), pp. 1645-51.
 - Humes, H. D., Lake, E. W. and Liu, S. (1995) 'Renal tubule cell repair following acute renal injury', *Miner Electrolyte Metab*, 21(4-5), pp. 353-65.
 - Iwahara, T., Bonasio, R., Narendra, V. and Reinberg, D. (2012) 'SIRT3 functions in the nucleus in the control of stress-related gene expression', *Mol Cell Biol*, 32(24), pp. 5022-34.
 - Izquierdo, M. C., Sanz, A. B., Mezzano, S., Blanco, J., Carrasco, S., Sanchez-Niño, M. D., Benito-Martín, A., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. and Ortiz, A. (2012) 'TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation', *Kidney Int*, 81(11), pp. 1098-107.
 - Jaenisch, R. and Bird, A. (2003) 'Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals', *Nat Genet*, 33 Suppl, pp. 245-54.
 - Jakubowski, A., Ambrose, C., Parr, M., Lincecum, J. M., Wang, M. Z., Zheng, T. S., Browning, B., Michaelson, J. S., Baetscher, M., Baestcher, M., Wang, B., Bissell, D. M. and Burkly, L. C. (2005) 'TWEAK induces liver progenitor cell proliferation', *J Clin Invest*, 115(9), pp. 2330-40.
 - Jarr, K. U., Eschricht, S., Burkly, L. C., Preusch, M., Katus, H. A., Frey, N. and Chorianopoulos, E. (2014) 'TNF-like weak inducer of apoptosis aggravates left ventricular dysfunction after myocardial infarction in mice', *Mediators Inflamm*, 2014, pp. 131950.
 - Jia, S., Noma, K. and Grewal, S. I. (2004) 'RNAi-independent heterochromatin nucleation by the stress-activated ATF/CREB family proteins', *Science*, 304(5679), pp. 1971-6.
 - Johnsson, P., Ackley, A., Vidarsdottir, L., Lui, W. O., Corcoran, M., Grandér, D. and Morris, K. V. (2013) 'A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells', *Nat Struct Mol Biol*, 20(4), pp. 440-6.
 - Joshi, A. A. and Struhl, K. (2005) 'Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation', *Mol Cell*, 20(6), pp. 971-8.
 - Justo, P., Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Winkles, J. A., Lorz, C., Egido, J. and Ortiz, A. (2006) 'Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK', *Kidney Int*, 70(10), pp. 1750-8.

- Kalunian, K. and Merrill, J. T. (2009) 'New directions in the treatment of systemic lupus erythematosus', *Curr Med Res Opin*, 25(6), pp. 1501-14.
- Kaufman, B. A., Durisic, N., Mativetsky, J. M., Costantino, S., Hancock, M. A., Grutter, P. and Shoubridge, E. A. (2007) 'The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures', *Mol Biol Cell*, 18(9), pp. 3225-36.
- Keogh, M. C., Kurdistani, S. K., Morris, S. A., Ahn, S. H., Podolny, V., Collins, S. R., Schuldiner, M., Chin, K., Punna, T., Thompson, N. J., Boone, C., Emili, A., Weissman, J. S., Hughes, T. R., Strahl, B. D., Grunstein, M., Greenblatt, J. F., Buratowski, S. and Krogan, N. J. (2005) 'Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex', *Cell*, 123(4), pp. 593-605.
- Khan, S. B., Cook, H. T., Bhangal, G., Smith, J., Tam, F. W. and Pusey, C. D. (2005) 'Antibody blockade of TNF-alpha reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis', *Kidney Int*, 67(5), pp. 1812-20.
- Kim, H. S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K. S., Aykin-Burns, N., Pennington, J. D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K. M., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, S. H., Singh, K. K., Abdulkadir, S. A., Spitz, D. R., Deng, C. X. and Gius, D. (2010) 'SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress', *Cancer Cell*, 17(1), pp. 41-52.
- Kitada, M., Kume, S. and Koya, D. (2014) 'Role of sirtuins in kidney disease', *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 23(1), pp. 75-9.
- Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A. M., Pape, U. J., Tahiliani, M., Bandukwala, H. S., An, J., Lamperti, E. D., Koh, K. P., Ganetzky, R., Liu, X. S., Aravind, L., Agarwal, S., Maciejewski, J. P. and Rao, A. (2010) 'Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2', *Nature*, 468(7325), pp. 839-43.
- Kong, X., Wang, R., Xue, Y., Liu, X., Zhang, H., Chen, Y., Fang, F. and Chang, Y. (2010) 'Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis', *PLoS One*, 5(7), pp. e11707.
- Kouzarides, T. (2007) 'Chromatin modifications and their function', *Cell*, 128(4), pp. 693-705.
- Lee, D. Y., Teyssier, C., Strahl, B. D. and Stallcup, M. R. (2005) 'Role of protein methylation in regulation of transcription', *Endocr Rev*, 26(2), pp. 147-70.
- Liaño, F. and Pascual, J. (1996) 'Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group', *Kidney Int*, 50(3), pp. 811-8.

- Linkermann, A., Stockwell, B. R., Krautwald, S. and Anders, H. J. (2014) 'Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure', *Nat Rev Immunol*, 14(11), pp. 759-67.
- Liu, H., Fergusson, M. M., Castilho, R. M., Liu, J., Cao, L., Chen, J., Malide, D., Rovira, I. I., Schimel, D., Kuo, C. J., Gutkind, J. S., Hwang, P. M. and Finkel, T. (2007) 'Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging', *Science*, 317(5839), pp. 803-6.
- Liu, M. Y. and Khachigian, L. M. (2009) 'Histone deacetylase-1 is enriched at the platelet-derived growth factor-D promoter in response to interleukin-1 β and forms a cytokine-inducible gene-silencing complex with NF-kappaB p65 and interferon regulatory factor-1', *J Biol Chem*, 284(50), pp. 35101-12.
- Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H. L., Bunkenborg, J., Streeper, R. S., Mostoslavsky, R., Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., Yang, Y., Chen, Y., Hirschey, M. D., Bronson, R. T., Haigis, M., Guarente, L. P., Farese, R. V., Weissman, S., Verdin, E. and Schwer, B. (2007) 'Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation', *Mol Cell Biol*, 27(24), pp. 8807-14.
- López-Lluch, G., Irusta, P. M., Navas, P. and de Cabo, R. (2008) 'Mitochondrial biogenesis and healthy aging', *Exp Gerontol*, 43(9), pp. 813-9.
- Lorz, C., Ortiz, A., Justo, P., González-Cuadrado, S., Duque, N., Gómez-Guerrero, C. and Egido, J. (2000) 'Proapoptotic Fas ligand is expressed by normal kidney tubular epithelium and injured glomeruli', *J Am Soc Nephrol*, 11(7), pp. 1266-77.
- Lynch, C. N., Wang, Y. C., Lund, J. K., Chen, Y. W., Leal, J. A. and Wiley, S. R. (1999) 'TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells', *J Biol Chem*, 274(13), pp. 8455-9.
- Maecker, H., Varfolomeev, E., Kischkel, F., Lawrence, D., LeBlanc, H., Lee, W., Hurst, S., Danilenko, D., Li, J., Filvaroff, E., Yang, B., Daniel, D. and Ashkenazi, A. (2005) 'TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity', *Cell*, 123(5), pp. 931-44.
- Maeshima, A., Yamashita, S. and Nojima, Y. (2003) 'Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney', *J Am Soc Nephrol*, 14(12), pp. 3138-46.
- Martín-Subero, J. I. and Esteller, M. (2011) 'Profiling epigenetic alterations in disease', *Adv Exp Med Biol*, 711, pp. 162-77.
- Martin, C. and Zhang, Y. (2005) 'The diverse functions of histone lysine methylation', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11), pp. 838-49.

- Mattick, J. S. and Rinn, J. L. (2015) 'Discovery and annotation of long noncoding RNAs', *Nat Struct Mol Biol*, 22(1), pp. 5-7.
- Medvedeva, N. V., Prozorovskiy, V. N., Ignatov, D. V., Druzilovskaya, O. S., Kudinov, V. A., Kasatkina, E. O., Tikhonova, E. G. and Ipatova, O. M. (2015) '[Pharmacological agents and transport nanosystems based on plant phospholipids]', *Biomed Khim*, 61(2), pp. 219-230.
- Metz-Kurschel, U., Kurschel, E., Wagner, K., Aulbert, E., Graben, N. and Philipp, T. (1990) 'Folate nephropathy occurring during cytotoxic chemotherapy with high-dose folinic acid and 5-fluorouracil', *Ren Fail*, 12(2), pp. 93-7.
- Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Müller, J. M., Schneider, R., Peters, A. H., Günther, T., Buettner, R. and Schüle, R. (2005) 'LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription', *Nature*, 437(7057), pp. 436-9.
- Misseri, R., Meldrum, D. R., Dinarello, C. A., Dagher, P., Hile, K. L., Rink, R. C. and Meldrum, K. K. (2005) 'TNF- α mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling', *Am J Physiol Renal Physiol*, 288(2), pp. F406-11.
- Mittal, A., Bhatnagar, S., Kumar, A., Lach-Trifilieff, E., Wauters, S., Li, H., Makonchuk, D. Y. and Glass, D. J. (2010) 'The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice', *J Cell Biol*, 188(6), pp. 833-49.
- Mohtat, D. and Susztak, K. (2010) 'Fine tuning gene expression: the epigenome', *Semin Nephrol*, 30(5), pp. 468-76.
- Moreno, J. A., Izquierdo, M. C., Sanchez-Niño, M. D., Suárez-Alvarez, B., Lopez-Larrea, C., Jakubowski, A., Blanco, J., Ramirez, R., Selgas, R., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., Ortiz, A. and Sanz, A. B. (2011) 'The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal klotho expression through NF κ B', *J Am Soc Nephrol*, 22(7), pp. 1315-25.
- Moreno, J. A., Izquierdo, M. C., Sanchez-Niño, M. D., Suárez-Alvarez, B., Lopez-Larrea, C., Jakubowski, A., Blanco, J., Ramirez, R., Selgas, R., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., Ortiz, A. and Sanz, A. B. (2011) 'The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal klotho expression through NF κ B', *J Am Soc Nephrol*, 22(7), pp. 1315-25.
- Morigi, M., Perico, L., Rota, C., Longaretti, L., Conti, S., Rottoli, D., Novelli, R., Remuzzi, G. and Benigni, A. (2015) 'Sirtuin 3-dependent mitochondrial dynamic improvements protect against acute kidney injury', *J Clin Invest*, 125(2), pp. 715-26.

- Munro, S. K., Mitchell, M. D. and Ponnampalam, A. P. (2013) 'Histone deacetylase inhibition by trichostatin A mitigates LPS induced TNF α and IL-10 production in human placental explants', *Placenta*, 34(7), pp. 567-73.
- Muñoz-García, B., Moreno, J. A., López-Franco, O., Sanz, A. B., Martín-Ventura, J. L., Blanco, J., Jakubowski, A., Burkly, L. C., Ortiz, A., Egido, J. and Blanco-Colio, L. M. (2009) 'Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) enhances vascular and renal damage induced by hyperlipidemic diet in ApoE-knockout mice', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(12), pp. 2061-8.
- Naito, M., Zager, R. A. and Bomsztyk, K. (2009) 'BRG1 increases transcription of proinflammatory genes in renal ischemia', *J Am Soc Nephrol*, 20(8), pp. 1787-96.
- Nakamura, Y., Ogura, M., Tanaka, D. and Inagaki, N. (2008) 'Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5', *Biochem Biophys Res Commun*, 366(1), pp. 174-9.
- Nakayama, M., Harada, N., Okumura, K. and Yagita, H. (2003) 'Characterization of murine TWEAK and its receptor (Fn14) by monoclonal antibodies', *Biochem Biophys Res Commun*, 306(4), pp. 819-25.
- Nakayama, M., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Okumura, K. and Yagita, H. (2000) 'Involvement of TWEAK in interferon gamma-stimulated monocyte cytotoxicity', *J Exp Med*, 192(9), pp. 1373-80.
- Naumann, M., Nieters, A., Hatada, E. N. and Scheidereit, C. (1993) 'NF-kappa B precursor p100 inhibits nuclear translocation and DNA binding of NF-kappa B/rel-factors', *Oncogene*, 8(8), pp. 2275-81.
- Nemoto, S., Fergusson, M. M. and Finkel, T. (2005) 'SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 {alpha}', *J Biol Chem*, 280(16), pp. 16456-60.
- Nogueiras, R., Habegger, K. M., Chaudhary, N., Finan, B., Banks, A. S., Dietrich, M. O., Horvath, T. L., Sinclair, D. A., Pfluger, P. T. and Tschöp, M. H. (2012) 'Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism', *Physiol Rev*, 92(3), pp. 1479-514.
- Novina, C. D. and Sharp, P. A. (2004) 'The RNAi revolution', *Nature*, 430(6996), pp. 161-4.
- Novoyatleva, T., Diehl, F., van Amerongen, M. J., Patra, C., Ferrazzi, F., Bellazzi, R. and Engel, F. B. (2010) 'TWEAK is a positive regulator of cardiomyocyte proliferation', *Cardiovasc Res*, 85(4), pp. 681-90.

- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. and Nakatani, Y. (1996) 'The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases', *Cell*, 87(5), pp. 953-9.
- Olsen, T. S., Olsen, H. S. and Hansen, H. E. (1985) 'Tubular ultrastructure in acute renal failure in man: epithelial necrosis and regeneration', *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 406(1), pp. 75-89.
- Onyango, P., Celic, I., McCaffery, J. M., Boeke, J. D. and Feinberg, A. P. (2002) 'SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21), pp. 13653-8.
- Ortega, A., Rámila, D., Ardura, J. A., Esteban, V., Ruiz-Ortega, M., Barat, A., Gazapo, R., Bosch, R. J. and Esbrit, P. (2006) 'Role of parathyroid hormone-related protein in tubulointerstitial apoptosis and fibrosis after folic acid-induced nephrotoxicity', *J Am Soc Nephrol*, 17(6), pp. 1594-603.
- Ortiz, A., Lorz, C., Catalán, M. P., Danoff, T. M., Yamasaki, Y., Egido, J. and Neilson, E. G. (2000) 'Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure', *Kidney Int*, 57(3), pp. 969-81.
- Ortiz, A., Sanchez-Niño, M. D., Izquierdo, M. C., Blanco-Colio, L. M., Selgas, R., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. and Sanz, A. B. (2011) 'TWEAK and the kidney: the dual role of a multifunctional cytokine', *Adv Exp Med Biol*, 691, pp. 323-35.
- Palacios, O. M., Carmona, J. J., Michan, S., Chen, K. Y., Manabe, Y., Ward, J. L., Goodyear, L. J. and Tong, Q. (2009) 'Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle', *Aging (Albany NY)*, 1(9), pp. 771-83.
- Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B. and Goeddel, D. V. (1984) 'Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin', *Nature*, 312(5996), pp. 724-9.
- Peschansky, V. J. and Wahlestedt, C. (2014) 'Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation', *Epigenetics*, 9(1), pp. 3-12.
- Petruzzella, V., Sardanelli, A. M., Scacco, S., Panelli, D., Papa, F., Trentadue, R. and Papa, S. (2012) 'Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in neurological disorders: genetics and pathogenetic mechanisms', *Adv Exp Med Biol*, 942, pp. 371-84.
- Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., Kim, G., Gupta, M., Rajamohan, S. B., Pillai, J. B., Samant, S., Ravindra, P. V., Isbatan, A. and Gupta, M. P. (2010) 'Exogenous NAD

- blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway', *J Biol Chem*, 285(5), pp. 3133-44.
- Poveda, J., Sanchez-Niño, M. D., Glorieux, G., Sanz, A. B., Egido, J., Vanholder, R. and Ortiz, A. (2014) 'p-cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells', *Nephrol Dial Transplant*, 29(1), pp. 56-64.
 - Poveda, J., Tabara, L. C., Fernandez-Fernandez, B., Martin-Cleary, C., Sanz, A. B., Selgas, R., Ortiz, A. and Sanchez-Niño, M. D. (2013) 'TWEAK/Fn14 and Non-Canonical NF-kappaB Signaling in Kidney Disease', *Front Immunol*, 4, pp. 447.
 - Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M. D., Verdin, E. and Chen, D. (2010) 'Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation', *Cell Metab*, 12(6), pp. 662-7.
 - Ramakrishnan, S., Ellis, L. and Pili, R. (2013) 'Histone modifications: implications in renal cell carcinoma', *Epigenomics*, 5(4), pp. 453-62.
 - Ramesh, G. and Reeves, W. B. (2002) 'TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity', *J Clin Invest*, 110(6), pp. 835-42.
 - Rato, L., Duarte, A. I., Tomás, G. D., Santos, M. S., Moreira, P. I., Socorro, S., Cavaco, J. E., Alves, M. G. and Oliveira, P. F. (2014) 'Pre-diabetes alters testicular PGC1- α /SIRT3 axis modulating mitochondrial bioenergetics and oxidative stress', *Biochim Biophys Acta*, 1837(3), pp. 335-44.
 - Remuzzi, G., Ruggenti, P. and Benigni, A. (1997) 'Understanding the nature of renal disease progression', *Kidney Int*, 51(1), pp. 2-15.
 - Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M. and Puigserver, P. (2005) 'Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1', *Nature*, 434(7029), pp. 113-8.
 - Rodríguez-Romo, R., Berman, N., Gómez, A. and Bobadilla, N. A. (2015) 'Epigenetic regulation in the acute kidney injury (AKI) to chronic kidney disease transition (CKD)', *Nephrology (Carlton)*.
 - Russell, L. K., Mansfield, C. M., Lehman, J. J., Kovacs, A., Courtois, M., Saffitz, J. E., Medeiros, D. M., Valencik, M. L., McDonald, J. A. and Kelly, D. P. (2004) 'Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner', *Circ Res*, 94(4), pp. 525-33.
 - Sabari, B. R., Tang, Z., Huang, H., Yong-Gonzalez, V., Molina, H., Kong, H. E., Dai, L., Shimada, M., Cross, J. R., Zhao, Y., Roeder, R. G. and Allis, C. D. (2015)

- 'Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation', *Mol Cell*, 58(2), pp. 203-15.
- Sanchez-Niño, M. D., Bozic, M., Córdoba-Lanús, E., Valcheva, P., Gracia, O., Ibarz, M., Fernandez, E., Navarro-Gonzalez, J. F., Ortiz, A. and Valdivielso, J. M. (2012) 'Beyond proteinuria: VDR activation reduces renal inflammation in experimental diabetic nephropathy', *Am J Physiol Renal Physiol*, 302(6), pp. F647-57.
 - Sanz, A. B., Izquierdo, M. C., Sanchez-Niño, M. D., Uceró, A. C., Egido, J., Ruiz-Ortega, M., Ramos, A. M., Putterman, C. and Ortiz, A. (2014) 'TWEAK and the progression of renal disease: clinical translation', *Nephrol Dial Transplant*, 29 Suppl 1, pp. i54-i62.
 - Sanz, A. B., Izquierdo, M. C., Sanchez-Niño, M. D., Uceró, A. C., Egido, J., Ruiz-Ortega, M., Ramos, A. M., Putterman, C. and Ortiz, A. (2014) 'TWEAK and the progression of renal disease: clinical translation', *Nephrol Dial Transplant*, 29 Suppl 1, pp. i54-i62.
 - Sanz, A. B., Justo, P., Sanchez-Niño, M. D., Blanco-Colio, L. M., Winkles, J. A., Kretzler, M., Jakubowski, A., Blanco, J., Egido, J., Ruiz-Ortega, M. and Ortiz, A. (2008) 'The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation', *J Am Soc Nephrol*, 19(4), pp. 695-703.
 - Sanz, A. B., Moreno, J. A., Sanchez-Niño, M. D., Uceró, A. C., Benito, A., Santamaria, B., Justo, P., Izquierdo, M. C., Egido, J., Blanco-Colio, L. M. and Ortiz, A. (2008b) 'TWEAKing renal injury', *Front Biosci*, 13, pp. 580-9.
 - Sanz, A. B., Sánchez-Niño, M. D., Izquierdo, M. C., Moreno, J. A., Uceró, A. C., Benito-Martín, A., Santamaría, B., Burgos, C., Egido, J., Ramos, A., Berzal, S., Coto, E., Ruiz-Ortega, M., Blanco-Colio, L. M. and Ortiz, A. (2008b) '[TWEAK, the facilitator of acute kidney injury]', *Nefrologia*, 28(6), pp. 587-92.
 - Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Izquierdo, M. C., Jakubowski, A., Justo, P., Blanco-Colio, L. M., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. and Ortiz, A. (2009) 'Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: a role in uninephrectomy induced renal hyperplasia', *J Cell Mol Med*, 13(9B), pp. 3329-42.
 - Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Izquierdo, M. C., Jakubowski, A., Justo, P., Blanco-Colio, L. M., Ruiz-Ortega, M., Selgas, R., Egido, J. and Ortiz, A. (2010a) 'TWEAK activates the non-canonical NFκB pathway in murine renal tubular cells: modulation of CCL21', *PLoS One*, 5(1), pp. e8955.
 - Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Ramos, A. M., Moreno, J. A., Santamaria, B., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. and Ortiz, A. (2010b) 'NF-κB in renal inflammation', *J Am Soc Nephrol*, 21(8), pp. 1254-62.

- Scher, M. B., Vaquero, A. and Reinberg, D. (2007) 'SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress', *Genes Dev*, 21(8), pp. 920-8.
- Schwer, B., North, B. J., Frye, R. A., Ott, M. and Verdin, E. (2002) 'The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase', *J Cell Biol*, 158(4), pp. 647-57.
- Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D. and Hake, S. B. (2007) 'Extraction, purification and analysis of histones', *Nat Protoc*, 2(6), pp. 1445-57.
- Shi, J., Jiang, B., Qiu, Y., Guan, J., Jain, M., Cao, X., Bauer, M., Su, L., Burkly, L. C., Leone, T. C., Kelly, D. P. and Liao, R. (2013) 'PGC1 α plays a critical role in TWEAK-induced cardiac dysfunction', *PLoS One*, 8(1), pp. e54054.
- Shi, T., Wang, F., Stieren, E. and Tong, Q. (2005) 'SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes', *J Biol Chem*, 280(14), pp. 13560-7.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J. R., Cole, P. A. and Casero, R. A. (2004) 'Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1', *Cell*, 119(7), pp. 941-53.
- Shimazu, T., Hirschey, M. D., Hua, L., Dittenhafer-Reed, K. E., Schwer, B., Lombard, D. B., Li, Y., Bunkenborg, J., Alt, F. W., Denu, J. M., Jacobson, M. P. and Verdin, E. (2010) 'SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production', *Cell Metab*, 12(6), pp. 654-61.
- Siew, E. D. and Davenport, A. (2015) 'The growth of acute kidney injury: a rising tide or just closer attention to detail?', *Kidney Int*, 87(1), pp. 46-61.
- Solez, K., Morel-Maroger, L. and Sraer, J. D. (1979) 'The morphology of "acute tubular necrosis" in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model', *Medicine (Baltimore)*, 58(5), pp. 362-76.
- Stallons, L. J., Whitaker, R. M. and Schnellmann, R. G. (2014) 'Suppressed mitochondrial biogenesis in folic acid-induced acute kidney injury and early fibrosis', *Toxicol Lett*, 224(3), pp. 326-32.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000) 'The language of covalent histone modifications', *Nature*, 403(6765), pp. 41-5.
- Sundaresan, N. R., Samant, S. A., Pillai, V. B., Rajamohan, S. B. and Gupta, M. P. (2008) 'SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70', *Mol Cell Biol*, 28(20), pp. 6384-401.

- Susztak, K. (2014) 'Understanding the epigenetic syntax for the genetic alphabet in the kidney', *J Am Soc Nephrol*, 25(1), pp. 10-7.
- Tábara, L. C., Poveda, J., Martin-Cleary, C., Selgas, R., Ortiz, A. and Sanchez-Niño, M. D. (2014) 'Mitochondria-targeted therapies for acute kidney injury', *Expert Rev Mol Med*, 16, pp. e13.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, Y., Khochbin, S., Ren, B. and Zhao, Y. (2011) 'Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification', *Cell*, 146(6), pp. 1016-28.
- Than, T. A., Lou, H., Ji, C., Win, S. and Kaplowitz, N. (2011) 'Role of cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-regulated transcription coactivator 3 (CRT3) in the initiation of mitochondrial biogenesis and stress response in liver cells', *J Biol Chem*, 286(25), pp. 22047-54.
- Tiller, G., Fischer-Posovszky, P., Laumen, H., Finck, A., Skurk, T., Keuper, M., Brinkmann, U., Wabitsch, M., Link, D. and Hauner, H. (2009) 'Effects of TWEAK (TNF superfamily member 12) on differentiation, metabolism, and secretory function of human primary preadipocytes and adipocytes', *Endocrinology*, 150(12), pp. 5373-83.
- Tirnitz-Parker, J. E., Viebahn, C. S., Jakubowski, A., Klopčič, B. R., Olynyk, J. K., Yeoh, G. C. and Knight, B. (2010) 'Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is a mitogen for liver progenitor cells', *Hepatology*, 52(1), pp. 291-302.
- Tran, M., Tam, D., Bardia, A., Bhasin, M., Rowe, G. C., Kher, A., Zsengeller, Z. K., Akhavan-Sharif, M. R., Khankin, E. V., Saintgeniez, M., David, S., Burstein, D., Karumanchi, S. A., Stillman, I. E., Arany, Z. and Parikh, S. M. (2011) 'PGC-1 α promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice', *J Clin Invest*, 121(10), pp. 4003-14.
- Tran, N. L., McDonough, W. S., Savitch, B. A., Sawyer, T. F., Winkles, J. A. and Berens, M. E. (2005) 'The tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)-fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) signaling system regulates glioma cell survival via NF κ B pathway activation and BCL-XL/BCL-W expression', *J Biol Chem*, 280(5), pp. 3483-92.
- Ucero, A. C., Benito-Martin, A., Fuentes-Calvo, I., Santamaria, B., Blanco, J., Lopez-Novoa, J. M., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., Burkly, L. C., Martinez-Salgado, C. and Ortiz, A. (2013) 'TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes kidney fibrosis and Ras-dependent proliferation of cultured renal fibroblast', *Biochim Biophys Acta*, 1832(10), pp. 1744-55.

- Ugur, S., Ulu, R., Dogukan, A., Gurel, A., Yigit, I. P., Gozel, N., Aygen, B. and Ilhan, N. (2015) 'The renoprotective effect of curcumin in cisplatin-induced nephrotoxicity', *Ren Fail*, 37(2), pp. 332-6.
- Vainshtein, A., Desjardins, E. M., Armani, A., Sandri, M. and Hood, D. A. (2015) 'PGC-1 α modulates denervation-induced mitophagy in skeletal muscle', *Skelet Muscle*, 5, pp. 9.
- Van Beneden, K., Geers, C., Pauwels, M., Mannaerts, I., Wissing, K. M., Van den Branden, C. and van Grunsven, L. A. (2013) 'Comparison of trichostatin A and valproic acid treatment regimens in a mouse model of kidney fibrosis', *Toxicol Appl Pharmacol*, 271(2), pp. 276-84.
- van Kooten, C., Daha, M. R. and van Es, L. A. (1999) 'Tubular epithelial cells: A critical cell type in the regulation of renal inflammatory processes', *Exp Nephrol*, 7(5-6), pp. 429-37.
- Vaquero, A. and Reinberg, D. (2009) 'Calorie restriction and the exercise of chromatin', *Genes Dev*, 23(16), pp. 1849-69.
- Venter, J. C. and Adams, M. D. and Myers, E. W. and Li, P. W. and Mural, R. J. and Sutton, G. G. and Smith, H. O. and Yandell, M. and Evans, C. A. and Holt, R. A. and Gocayne, J. D. and Amanatides, P. and Ballew, R. M. and Huson, D. H. and Wortman, J. R. and Zhang, Q. and Kodira, C. D. and Zheng, X. H. and Chen, L. and Skupski, M. and Subramanian, G. and Thomas, P. D. and Zhang, J. and Gabor Miklos, G. L. and Nelson, C. and Broder, S. and Clark, A. G. and Nadeau, J. and McKusick, V. A. and Zinder, N. and Levine, A. J. and Roberts, R. J. and Simon, M. and Slayman, C. and Hunkapiller, M. and Bolanos, R. and Delcher, A. and Dew, I. and Fasulo, D. and Flanagan, M. and Florea, L. and Halpern, A. and Hannenhalli, S. and Kravitz, S. and Levy, S. and Mobarry, C. and Reinert, K. and Remington, K. and Abu-Threideh, J. and Beasley, E. and Biddick, K. and Bonazzi, V. and Brandon, R. and Cargill, M. and Chandramouliswaran, I. and Charlab, R. and Chaturvedi, K. and Deng, Z. and Di Francesco, V. and Dunn, P. and Eilbeck, K. and Evangelista, C. and Gabrielian, A. E. and Gan, W. and Ge, W. and Gong, F. and Gu, Z. and Guan, P. and Heiman, T. J. and Higgins, M. E. and Ji, R. R. and Ke, Z. and Ketchum, K. A. and Lai, Z. and Lei, Y. and Li, Z. and Li, J. and Liang, Y. and Lin, X. and Lu, F. and Merkulov, G. V. and Milshina, N. and Moore, H. M. and Naik, A. K. and Narayan, V. A. and Neelam, B. and Nusskern, D. and Rusch, D. B. and Salzberg, S. and Shao, W. and Shue, B. and Sun, J. and Wang, Z. and Wang, A. and Wang, X. and Wang, J. and Wei, M. and Wides, R. and Xiao, C. and Yan, C. and Yao, A. and Ye, J. and Zhan, M. and Zhang, W. and Zhang, H. and Zhao, Q. and Zheng, L. and Zhong, F. and Zhong, W. and Zhu, S. and

Zhao, S. and Gilbert, D. and Baumhueter, S. and Spier, G. and Carter, C. and Cravchik, A. and Woodage, T. and Ali, F. and An, H. and Awe, A. and Baldwin, D. and Baden, H. and Barnstead, M. and Barrow, I. and Beeson, K. and Busam, D. and Carver, A. and Center, A. and Cheng, M. L. and Curry, L. and Danaher, S. and Davenport, L. and Desilets, R. and Dietz, S. and Dodson, K. and Doup, L. and Ferriera, S. and Garg, N. and Gluecksmann, A. and Hart, B. and Haynes, J. and Haynes, C. and Heiner, C. and Hladun, S. and Hostin, D. and Houck, J. and Howland, T. and Ibegwam, C. and Johnson, J. and Kalush, F. and Kline, L. and Koduru, S. and Love, A. and Mann, F. and May, D. and McCawley, S. and McIntosh, T. and McMullen, I. and Moy, M. and Moy, L. and Murphy, B. and Nelson, K. and Pfannkoch, C. and Pratts, E. and Puri, V. and Qureshi, H. and Reardon, M. and Rodriguez, R. and Rogers, Y. H. and Romblad, D. and Ruhfel, B. and Scott, R. and Sitter, C. and Smallwood, M. and Stewart, E. and Strong, R. and Suh, E. and Thomas, R. and Tint, N. N. and Tse, S. and Vech, C. and Wang, G. and Wetter, J. and Williams, S. and Williams, M. and Windsor, S. and Winn-Deen, E. and Wolfe, K. and Zaveri, J. and Zaveri, K. and Abril, J. F. and Guigó, R. and Campbell, M. J. and Sjolander, K. V. and Karlak, B. and Kejariwal, A. and Mi, H. and Lazareva, B. and Hatton, T. and Narechania, A. and Diemer, K. and Muruganujan, A. and Guo, N. and Sato, S. and Bafna, V. and Istrail, S. and Lippert, R. and Schwartz, R. and Walenz, B. and Yooseph, S. and Allen, D. and Basu, A. and Baxendale, J. and Blick, L. and Caminha, M. and Carnes-Stine, J. and Caulk, P. and Chiang, Y. H. and Coyne, M. and Dahlke, C. and Mays, A. and Dombroski, M. and Donnelly, M. and Ely, D. and Esparham, S. and Fosler, C. and Gire, H. and Glanowski, S. and Glasser, K. and Glodek, A. and Gorokhov, M. and Graham, K. and Gropman, B. and Harris, M. and Heil, J. and Henderson, S. and Hoover, J. and Jennings, D. and Jordan, C. and Jordan, J. and Kasha, J. and Kagan, L. and Kraft, C. and Levitsky, A. and Lewis, M. and Liu, X. and Lopez, J. and Ma, D. and Majoros, W. and McDaniel, J. and Murphy, S. and Newman, M. and Nguyen, T. and Nguyen, N. and Nodell, M. and Pan, S. and Peck, J. and Peterson, M. and Rowe, W. and Sanders, R. and Scott, J. and Simpson, M. and Smith, T. and Sprague, A. and Stockwell, T. and Turner, R. and Venter, E. and Wang, M. and Wen, M. and Wu, D. and Wu, M. and Xia, A. and Zandieh, A. and Zhu, X. (2001) 'The sequence of the human genome', *Science*, 291(5507), pp. 1304-51.

- Wade, P. A. (2001) 'Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression', *Bioessays*, 23(12), pp. 1131-7.
- Wan, F. and Lenardo, M. J. (2009) 'Specification of DNA binding activity of NF-kappaB proteins', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(4), pp. a000067.

- Wang, D., Fung, J. N., Tuo, Y., Hu, L. and Chen, C. (2010) 'TWEAK/Fn14 promotes apoptosis of human endometrial cancer cells via caspase pathway', *Cancer Lett*, 294(1), pp. 91-100.
- Wang, K. C. and Chang, H. Y. (2011) 'Molecular mechanisms of long noncoding RNAs', *Mol Cell*, 43(6), pp. 904-14.
- Wang, Y., Ding, M., Chaudhari, S., Ding, Y., Yuan, J., Stankowska, D., He, S., Krishnamoorthy, R., Cunningham, J. T. and Ma, R. (2013) 'Nuclear factor κ B mediates suppression of canonical transient receptor potential 6 expression by reactive oxygen species and protein kinase C in kidney cells', *J Biol Chem*, 288(18), pp. 12852-65.
- Wilusz, J. E., Sunwoo, H. and Spector, D. L. (2009) 'Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world', *Genes Dev*, 23(13), pp. 1494-504.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C. and Spiegelman, B. M. (1999) 'Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1', *Cell*, 98(1), pp. 115-24.
- Yap, S. C. and Lee, H. T. (2012) 'Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence', *Anesthesiology*, 116(5), pp. 1139-48.
- Yilmaz, M. I., Carrero, J. J., Ortiz, A., Martín-Ventura, J. L., Sonmez, A., Saglam, M., Yaman, H., Yenicesu, M., Egido, J. and Blanco-Colio, L. M. (2009) 'Soluble TWEAK plasma levels as a novel biomarker of endothelial function in patients with chronic kidney disease', *Clin J Am Soc Nephrol*, 4(11), pp. 1716-23.
- Zager, R. A. and Johnson, A. C. (2009) 'Renal ischemia-reperfusion injury upregulates histone-modifying enzyme systems and alters histone expression at proinflammatory/profibrotic genes', *Am J Physiol Renal Physiol*, 296(5), pp. F1032-41.
- Zhang, B., Ramesh, G., Uematsu, S., Akira, S. and Reeves, W. B. (2008) 'TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity', *J Am Soc Nephrol*, 19(5), pp. 923-32.
- Zheng, L., Sinniah, R. and Hsu, S. I. (2006) 'In situ glomerular expression of activated NF- κ B in human lupus nephritis and other non-proliferative proteinuric glomerulopathy', *Virchows Arch*, 448(2), pp. 172-83.
- Zhou, L., Li, Y., Zhou, D., Tan, R. J. and Liu, Y. (2013) 'Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/ β -catenin signaling', *J Am Soc Nephrol*, 24(5), pp. 771-85.

VIII. ANEXO

Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en:

- **Ruiz-Andres O**, Sanchez-Niño MD, Cannata-Ortiz P, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. Histone lysine-crotonylation in acute kidney injury. *Dis Model Mech*. 2016 (PMID: 27125278)
- **Ruiz-Andres O**, Suares-Alvarez B, Sánchez-Ramos C, Monsalve M, Sanchez-Niño MD, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. The inflammatory cytokine TWEAK decreases PGC-1 α expression and mitochondrial function in acute kidney injury. *Kidney Int*. 2015 Nov4 (PMID: 26535995)

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:

- Ferroptosis, but not necroptosis, plays an important role in nephrotoxic folic acid induce-acute kidney injury. Matin-Sanchez D, **Ruiz-Andres O**, Poveda J, Carrasco S, Cannata-Ortiz P, Sanchez-Niño MD, Ruiz-Ortega M, Egido J, Linkermann A, Ortiz A, Sanz AB. *J Am Soc Nephrol*. 2016. [Epub ahead of print]
- Out of the TWEAKlight: Elucidating the role of FN14 and TWEAK in Acute Kidney Injury. Sanz AB, **Ruiz-Andres O**, Sanchez-Niño MD, Ruiz-Ortega M, Ramos AM, Ortiz A. *Semin Nephrol*. 2016 Jan (doi: 10.1016/j.seminephrol.2016.03.006)
- Macrophages and recently identified forms of cell death. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Gonzalez-Espinoza L, Ucero AC, Poveda J, **Ruiz-Andres O**, Ruiz Ortega M, Selgas R, Egido J, Ortiz A. *Int Rev Immunol*. 2014 Jan;33(1):9-22. (PMID: 23802146)
- Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. Izquierdo MC, Perez-Gomez MV, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, **Ruiz-Andres O**, Poveda J, Moreno JA, Egido J, Ortiz A. *Nephrol Dial Transplant*. 2012. (PMID: 23258814)
- Acute kidney injury transcriptomics unveils a relationship between inflammation and ageing. Izquierdo MC, Sanz AB, Sánchez-Niño MD, Pérez- Gómez MV, Ruiz-Ortega M, Poveda J, **Ruiz-Andres O**, Ramos AM, Moreno JA, Egido J, Ortiz A. *Nefrología* Vol.32, 2012. (PMID: 23093094)
- Inflammatory Cytokines and Survival Factors from Serum Modulate Tweak-Induced Apoptosis in PC-3 Prostate Cancer Cells. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Carrasco S, Manzarbeitia F, **Ruiz-Andres O**, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Gonzalez-Enguita C, Egido J, Ortiz A. *PLoS One*. 2012;7(10):e47440. (PMID: 23077618)
- MIF, CD74 and other partners in kidney disease: Tales of a promiscuous couple. Sanchez-Niño MD, Sanz AB, **Ruiz-Andres O**, Poveda J, Izquierdo MC, Selgas R, Egido J, Ortiz A. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012 Sep 6. IDIPaz, Servicio de Nefrología, Madrid, Spain. (PMID: 22959722)

PATENTES

Derivados del Crotonato para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica y fracaso renal agudo (nº de solicitud: P201531677).

SOLICITANTES: Olga Ruiz-Andres, M^a Dolores Sanchez-Niño, Ana Belen Sanz, Alberto Ortiz

FECHA DE CONCESIÓN: 19 de noviembre 2015

ENTIDAD TITULAR: IIS-Fundación Jiménez Díaz

RESEARCH ARTICLE

Histone lysine crotonylation during acute kidney injury in mice

Olga Ruiz-Andres^{1,2,3}, Maria Dolores Sanchez-Niño^{1,2,3}, Pablo Cannata-Ortiz^{4,5}, Marta Ruiz-Ortega^{1,2,3,6}, Jesus Egido^{1,2,6}, Alberto Ortiz^{1,2,3,6,*} and Ana Belen Sanz^{1,2,3,*}†

ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) is a potentially lethal condition for which no therapy is available beyond replacement of renal function. Post-translational histone modifications modulate gene expression and kidney injury. Histone crotonylation is a recently described post-translational modification. We hypothesized that histone crotonylation might modulate kidney injury. Histone crotonylation was studied in cultured murine proximal tubular cells and in kidneys from mice with AKI induced by folic acid or cisplatin. Histone lysine crotonylation was observed in tubular cells from healthy murine and human kidney tissue. Kidney tissue histone crotonylation increased during AKI. This was reproduced by exposure to the protein TWEAK in cultured tubular cells. Specifically, ChIP-seq revealed enrichment of histone crotonylation at the genes encoding the mitochondrial biogenesis regulator PGC-1 α and the sirtuin-3 deacetylase in both TWEAK-stimulated tubular cells and in AKI kidney tissue. To assess the role of crotonylation in kidney injury, crotonate was used to increase histone crotonylation in cultured tubular cells or in the kidneys *in vivo*. Crotonate increased the expression of PGC-1 α and sirtuin-3, and decreased CCL2 expression in cultured tubular cells and healthy kidneys. Systemic crotonate administration protected from experimental AKI, preventing the decrease in renal function and in kidney PGC-1 α and sirtuin-3 levels as well as the increase in CCL2 expression. For the first time, we have identified factors such as cell stress and crotonate availability that increase histone crotonylation *in vivo*. Overall, increasing histone crotonylation might have a beneficial effect on AKI. This is the first observation of the *in vivo* potential of the therapeutic manipulation of histone crotonylation in a disease state.

KEY WORDS: Acute kidney injury, Epigenetics, Histone, Inflammation, Tubular cell

INTRODUCTION

Post-translational modifications of proteins are involved in chronic kidney disease and cardiovascular disease (Gajjala et al., 2015). Indeed, mounting evidence suggests that histone post-translational modifications, such as methylation, acetylation or phosphorylation, play a key role in diverse biological processes, such as development, cell differentiation, cell death and inflammation (Berdasco and Esteller, 2010). Indeed, aberrant histone post-translational modification contributes to disease (Berdasco and Esteller, 2010).

Histone post-translational modifications regulate chromatin-templated processes through two major mechanisms (Kouzarides, 2007): modulating chromatin packaging and regulating chromatin structure and function by recruiting binding proteins specific to the post-translational modification, which recognize modified histones. Alternatively, histone post-translational modifications can also inhibit the interaction of specific binders with chromatin. Recent studies have identified lysine crotonylation (Kcr) as a novel evolutionarily conserved histone post-translational modification that is present in several somatic tissues from adult mice (Tan et al., 2011). As recently described, histone crotonylation is mechanistically and functionally different from histone lysine acetylation (Tan et al., 2011; Sabari et al., 2015). Histone crotonylation was observed in kidney tissue, suggesting that it might play a role in epigenetic regulation of gene expression during kidney injury (Tan et al., 2011).

There is as yet very little knowledge about the regulation and function of histone crotonylation during tissue injury. Crotonate is a short-chain unsaturated carboxylic acid ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$) that increases histone crotonylation in cultured non-renal cells (Tan et al., 2011; Sabari et al., 2015), but its effect *in vivo* has not been addressed (Tan et al., 2011). Sirtuin-3 (SIRT3) is a histone deacetylase, also recently identified as a deacetylase (Tan et al., 2011). SIRT3 is a member of the sirtuin family of NAD(+)-dependent deacetylases (Huang et al., 2010; Scher et al., 2007) that associates with chromatin to repress nearby genes (Shechter et al., 2007; Iwahara et al., 2012). SIRT3 is present both in mitochondria and nuclei (Scher et al., 2007; Nakamura et al., 2008; Sundaresan et al., 2008), and is expressed in kidneys and metabolically active tissues. Under physiological and stress conditions, SIRT3 and peroxisome-proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) regulate the expression of each other (Shi et al., 2005; Palacios et al., 2009; Than et al., 2011; Giralt et al., 2011). PGC-1 α regulates gluconeogenesis and mitochondrial biogenesis and respiration. SIRT3 is a mediator of PGC-1 α effects on mitochondrial biogenesis (Kong et al., 2010). PGC-1 α is downregulated during acute kidney injury (AKI) (Ruiz-Andres et al., 2015; Tran et al., 2011), a condition characterized by a sudden, potentially prolonged, reduction of the renal glomerular filtration rate causing azotemia. AKI is associated with high morbidity and mortality rates and there is no therapy to treat established AKI beyond replacement of kidney function (Berger and Moeller, 2014). Proximal tubules are rich in mitochondria and are key sites of injury during AKI. An improved understanding of pathogenic pathways involved in AKI might provide clues to design novel therapeutic approaches. Inflammation and cell death are key contributors to AKI (Linkermann et al., 2014; Garcia-Cenador et al., 2013). In this regard, the protein tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) has recently been shown to be a key contributor to AKI and kidney injury in general (Ortiz et al., 2011; Sanz et al., 2011). TWEAK is a cytokine of the TNF superfamily that activates the Fn14 receptor, and has multiple actions on kidney cells. Thus,

¹Nephrology, IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Madrid 28040, Spain. ²School of Medicine, UAM, Madrid 28029, Spain. ³REDinREN, Madrid 28040, Spain.

⁴Pathology, IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Madrid 28040, Spain. ⁵School of Medicine, UAM, Madrid 28029, Spain. ⁶IRSIN, Madrid 28003, Spain.

*These authors contributed equally to this work

†Authors for correspondence (aortiz@fjd.es; asanz@fjd.es)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

TWEAK promotes kidney inflammation by increasing chemokine secretion by renal cells and decreasing the expression of nephroprotective factors such as klotho, promotes tubular cell proliferation in a permissive environment, and induces mesangial and tubular cell apoptosis under proinflammatory conditions (Sanz et al., 2011). TWEAK decreases PGC-1 α and target gene expression in tubular cells through nuclear factor κ B (NF κ B) activation and histone deacetylation (Ruiz-Andres et al., 2015). Given that the actions of TWEAK are mediated through the recruitment of signaling mechanisms that include NF κ B activation and histone acetylation, we hypothesized that TWEAK might also modulate histone lysine crotonylation. Furthermore, because epigenetic changes are also observed in AKI, and histone deacetylase (HDAC) inhibitors might protect from kidney injury (Van Beneden et al., 2011, 2013), we further hypothesized that histone lysine crotonylation might be a contributor to and a therapeutic target in AKI.

We have now explored histone crotonylation regulation and function in cultured kidney tubular epithelial cells and during kidney injury *in vivo*. Specifically, we have observed that histone lysine crotonylation is increased during AKI and by inflammatory cytokines such as TWEAK in tubular cells. Crotonate increased histone lysine crotonylation and PGC-1 α expression in cultured tubular cells and in the kidney *in vivo*, and protected from AKI.

RESULTS

Histone crotonylation is increased in kidney tubular cells during acute kidney injury

The histone crotonylation pattern during renal injury was explored in detail in an established mouse model of AKI induced by a folic acid overdose, and the results were confirmed in experimental cisplatin-induced AKI. In folic-acid-induced AKI, as in other experimental models and human AKI, loss of renal function, tubular cell injury and interstitial inflammation were observed (Sanz et al., 2008a).

Consistent with prior reports (Tan et al., 2011), histone crotonylation was observed in healthy murine kidney tissue when assessed by western blotting (Fig. 1A) or immunohistochemistry (Fig. 1B). Western blotting identified histones as crotonylated proteins, whereas immunohistochemistry localized lysine crotonylation mainly to tubular cell nuclei (Fig. 1B). Western blotting showed that there was an increase in the overall histone crotonylation in the folic-acid-induced AKI kidney tissue (Fig. 1A). Similar results were observed in cisplatin-induced AKI at 72 h (Fig. S1). The rest of the detailed studies discussed in the manuscript were obtained in the folic acid model. We also explored the histone H3 crotonylation (H3k9cr) pattern during renal injury. Consistent with the finding of overall histone crotonylation, western blotting showed that there was an increase in kidney histone H3 crotonylation in folic-acid-induced AKI tissue (Fig. S2A). Immunohistochemistry identified tubular cells as sites of lysine crotonylation during AKI (Fig. 1B). Nuclear localization of lysine crotonylation consistent with histone crotonylation was also observed in cultured murine proximal tubular cells by immunofluorescence (Fig. 1C). As was the case *in vivo*, there were different degrees of lysine crotonylation in individual cultured tubular cells, suggesting that this is a regulated and dynamic process. Cell separation into nuclei and cytosol showed that there was a faint crotonylated protein band in nuclei that corresponded to the size of histones (Fig. 1D). Thus, histones appear to be the most abundant crotonylated proteins in kidney tubular cells. Immunohistochemistry also identified nuclear lysine crotonylation in diseased human kidney tubular cells (Fig. 1E).

TWEAK increases histone crotonylation in cultured kidney tubular cells

Next, we explored the hypothesis that inflammatory mediators of AKI could modulate histone crotonylation. TWEAK is a key mediator of AKI that promotes inflammatory responses in cultured tubular cells but has no direct cytotoxicity if used in the absence of other inflammatory mediators (Sanz et al., 2010b; Izquierdo et al., 2012). Hence, we studied the effect of TWEAK on histone crotonylation in kidney cells. TWEAK increased histone crotonylation at 6 and 24 h in cultured tubular cells (Fig. 2). These results suggest that inflammatory cytokines can regulate the histone crotonylation status in kidney cells.

At this point, we also explored the hypothesis that direct cytotoxicity might promote histone crotonylation. As is the case for folic-acid-induced AKI, ischemia-reperfusion-induced AKI and other forms of AKI, cisplatin promotes an inflammatory response that amplifies kidney injury *in vivo* (Zhang et al., 2008; Baek et al., 2015). However, in contrast to TWEAK, cisplatin has a direct toxic effect on cultured tubular cells. In this regard, cisplatin at concentrations that induced direct toxicity in cultured tubular cells, did not modify histone crotonylation (Fig. S3). These results indicate that cytotoxicity and histone crotonylation can be dissociated in cultured tubular cells and argue for the involvement of additional factors *in vivo*.

Crotonate increases histone crotonylation and elicits biological responses in cultured tubular cells

Next, we searched for potential target genes of histone crotonylation whose expression is differentially regulated in AKI. PGC-1 α is a regulator of mitochondrial biogenesis that is decreased in AKI, whereas SIRT3 is a decrotonylase, and both regulate the expression of each other. Therefore, as a representative downregulated gene we chose PGC-1 α , because it regulates SIRT3 expression (Giralt et al., 2011; Kong et al., 2010; Bell and Guarente, 2011). Moreover, TWEAK decreases PGC-1 α expression by epigenetic mechanisms involving histone acetylation (Ruiz-Andres et al., 2015). ChIP-seq analysis using the pan anti-crotonyl-lysine antibody showed that PGC-1 α and SIRT3 were more enriched in crotonylated histones in tubular cells treated with TWEAK and in kidneys with AKI (Fig. 3F,G). To study the effect of crotonylation on PGC-1 α and SIRT3 expression, cells were pretreated with crotonate because exogenous crotonate increased histone crotonylation in cultured tubular cells (Fig. 3A). This is consistent with findings in non-renal cells (Tan et al., 2011; Sabari et al., 2015). Crotonate increased tubular cell PGC-1 α mRNA and protein levels (Fig. 3B,C). As representative upregulated gene, we chose CCL2 because it encodes the MCP-1 chemokine, a promoter of kidney injury (Sanz et al., 2010a). Crotonate decreased tubular cell CCL2 mRNA in cultured cells (Fig. 3D). Taken together, these results suggest that histone crotonylation could play an overall protective role in kidney injury by promoting upregulation of some protective genes and downregulation of genes involved in tissue injury. Crotonate also increased SIRT3 mRNA levels in cultured tubular cells in a time-dependent manner (Fig. 3E), suggesting the activation of a negative-feedback loop.

Crotonate did not promote tubular cell death nor proliferation as assessed by the presence of hypodiploid cells or by analyzing the proportion of cells in the S/M phases by flow cytometry (Fig. S4), nor did it increase cell detachment as observed by phase-contrast microscopy (data not shown). Mannitol, an osmolarity control, did not modify histone crotonylation at concentrations equimolar to the crotonate concentrations used, arguing against a role of osmolarity in modulating histone crotonylation (Fig. S5).

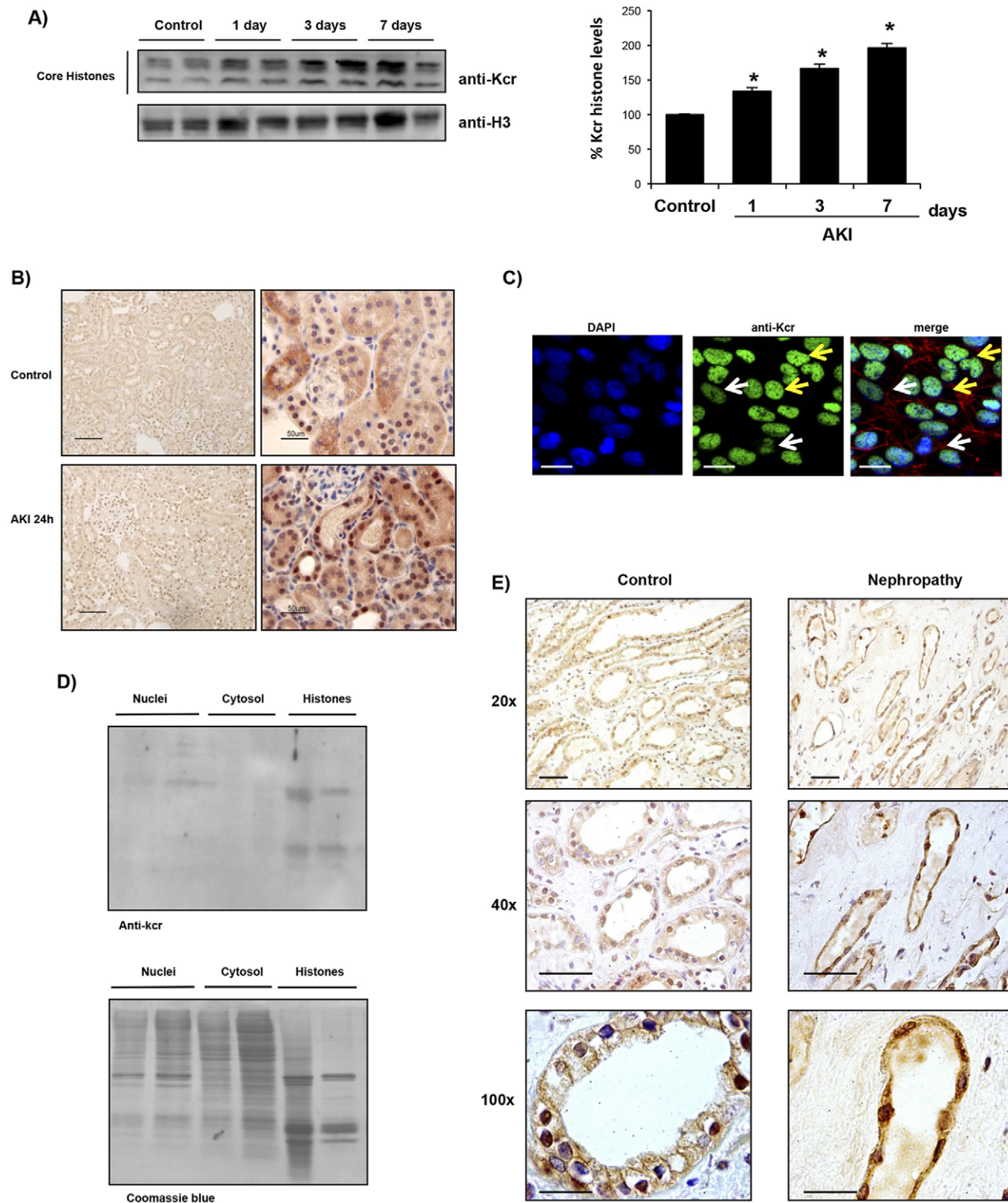


Fig. 1. Histone crotonylation in kidney tubular cells. (A) Western blot of murine healthy control kidneys and animals subjected to acute kidney injury (AKI) induced by a folic acid overdose. A quantification expressed as the percentage change of crotonylated histones (anti-Kcr) over control is shown to the right (mean±s.e.m. of five animals per group). Histone-3 was used as a loading control. **P*<0.05 vs control (nonparametric Mann–Whitney *U*-test). (B) Immunohistochemistry showing that histone crotonylation is mainly localized to tubular cell nuclei in murine kidneys. Representative staining of crotonylated histones (brown) counterstained with hematoxylin (blue). Scale bars: 100 μ m (left-hand panels); 50 μ m (right-hand panels). (C) Nuclear localization of histone crotonylation (green) was also observed in cultured murine proximal tubular cells. Nuclei were stained with DAPI (blue) and the actin cytoskeleton with fluorescent phalloidin (red). Note several degrees of histone crotonylation is observed; some cells have a lower staining intensity (white arrows) than others (yellow arrows). Scale bars: 5 μ m. (D) Western blotting and Coomassie Blue stain of extracts from cultured tubular cells. There is a stronger Kcr signal in histones, corresponding to the faint bands in nuclei and the low cytosol signal. (E) Immunohistochemistry showing that histone crotonylation is also localized to tubular cells in human kidneys. Representative staining of histone crotonylation (brown) counterstained with hematoxylin (blue). Scale bars: 50 μ m (20 \times panels); 50 μ m (40 \times panels); 20 μ m (100 \times panels).

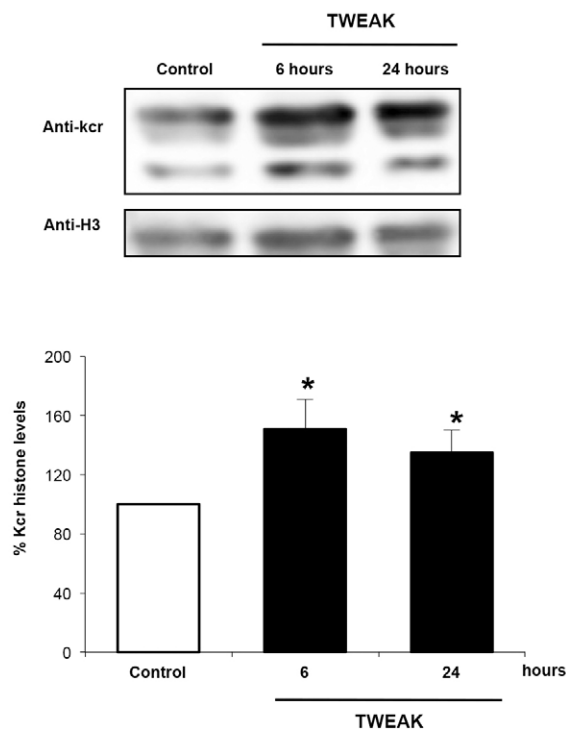


Fig. 2. TWEAK increases histone crotonylation in kidney tubular cells. Western blotting of histone crotonylation (anti-Kcr) in cultured murine proximal tubular cells stimulated with 100 ng/ml TWEAK. Data from five independent experiments is expressed as the mean \pm s.e.m. Results are expressed as percentage change of crotonylated histones over control. * P <0.05 vs control (Student's t -test).

Crotonate increases histone crotonylation and modulates regulated gene expression in mouse kidney

We explored whether crotonate modulates kidney histone crotonylation *in vivo*. Systemic administration of crotonate increased histone crotonylation in mouse kidney in a dose- and time-dependent manner (Fig. 4A,B). The 6 mmol/kg body weight crotonate dose did not significantly change kidney histone crotonylation (Fig. S6A) or PGC-1 α mRNA expression (Fig. S6B) at 24 h. Thus, 12 mmol/kg body weight crotonate was used for further experiments and was found to increase whole kidney histone crotonylation (Fig. 4), PGC-1 α mRNA levels (Fig. 5A) and PGC-1 α protein (Fig. 5B), and to decrease kidney CCL2 mRNA levels (Fig. 5C). Thus, the potential nephroprotective actions of crotonate observed in cultured tubular cells (increased expression of the nephroprotective gene PGC-1 α and decreased inflammatory gene expression) was reproduced *in vivo*.

Given that the SIRT3 deacetylase (Bao et al., 2014) and PGC-1 α each regulate each other under physiological and stress conditions (Shi et al., 2005; Palacios et al., 2009; Than et al., 2011; Giralt et al., 2011), we studied the effect of exogenous crotonate on kidney SIRT3 expression *in vivo* and found that crotonate increased whole kidney SIRT3 mRNA (Fig. 5D) and protein levels (Fig. 5E). This is consistent with the effects observed in cultured tubular cells and is again suggestive of activation of a negative-feedback loop.

Crotonate protects from experimental AKI

We next explored whether crotonate was nephroprotective *in vivo*. Mice were pretreated with 12 mmol/kg body weight crotonate, and 24 h later, AKI was induced by a folic acid overdose and mice were

killed at 72 h, when renal failure peaks (Sanz et al., 2010b). First, we observed that crotonate resulted in lower serum levels of BUN and creatinine, markers of renal dysfunction severity, and in lower KIM-1 mRNA levels, a marker of kidney injury (Fig. 6A). PAS-stained kidney sections revealed a trend towards decreased tubular injury in crotonate-treated mice (Fig. S7). AKI was associated with increased CCL2 expression (Sanz et al., 2010b) and reduced whole kidney SIRT3 expression (Fig. S8) within the time points studied. In this line, systemic administration of crotonate prevented the decrease in kidney PGC-1 α and SIRT3 levels in AKI (Fig. 6B,C,E,F) as well as the increase in CCL2 mRNA expression (Fig. 6D). This suggests a protective effect of crotonate, and thereby of histone crotonylation, against inflammation and mitochondrial stress during AKI.

TWEAK downregulates SIRT3 and this is prevented by crotonate

As recently described, increased histone crotonylation in response to crotonate loading might depend on increased substrate (crotonyl-CoA) availability (Sabari et al., 2015). However, the mechanism of increased histone crotonylation following TWEAK stimulation remained unclear. Thus, we explored whether TWEAK regulated the expression of the SIRT3 deacetylase and observed that TWEAK downregulated SIRT3 at mRNA and protein levels in cultured tubular cells (Fig. 7A,B) and in whole kidney *in vivo* (Fig. 7C,D). TWEAK-induced SIRT3 downregulation was prevented by crotonate in cultured tubular cells (Fig. 7E,F). These data suggest that decreased SIRT3 expression might be one of the factors contributing to increased kidney cell histone crotonylation in response to TWEAK.

DISCUSSION

The main findings of this study are that the degree of histone crotonylation in kidney tubular cells is modified by certain cell stressors or crotonate. Furthermore, increasing histone crotonylation was beneficial overall in AKI. This is the first observation of the *in vivo* potential of the therapeutic manipulation of histone crotonylation in a disease state.

Histones were the most abundant crotonylated proteins. The fact that increased histone crotonylation was found under stress conditions, be it AKI or exposure to a proinflammatory cytokine, begs the question of what is the overall role of crotonylation in kidney injury. As is the case with other histone post-translational modifications, it is expected that, in response to the microenvironment, expression of some genes will increase whereas that of other genes will decrease depending on the degree of histone crotonylation. Despite this expected heterogeneity, therapeutic agents targeting other histone post-translational modifications have been beneficial in diverse pathological conditions, including kidney injury, even when potentially impacting the expression of multiple genes with diverse or even opposing functions. For example, HDAC inhibitors such as trichostatin A are protective in experimental models of kidney fibrosis (Van Beneden et al., 2013) and selectively mitigate the stimulatory effect of lipopolysaccharide on inflammatory cytokine expression (Munro et al., 2013). We hypothesized that overall interference with histone crotonylation might have a beneficial or deleterious effect in AKI. We have now shown that increasing overall histone crotonylation by exposure to crotonate has potentially beneficial effects on tubular cells in culture and *in vivo*, including an increased expression of the mitochondrial biogenesis regulator PGC-1 α and decreased chemokine expression. Consistent with these findings, crotonate

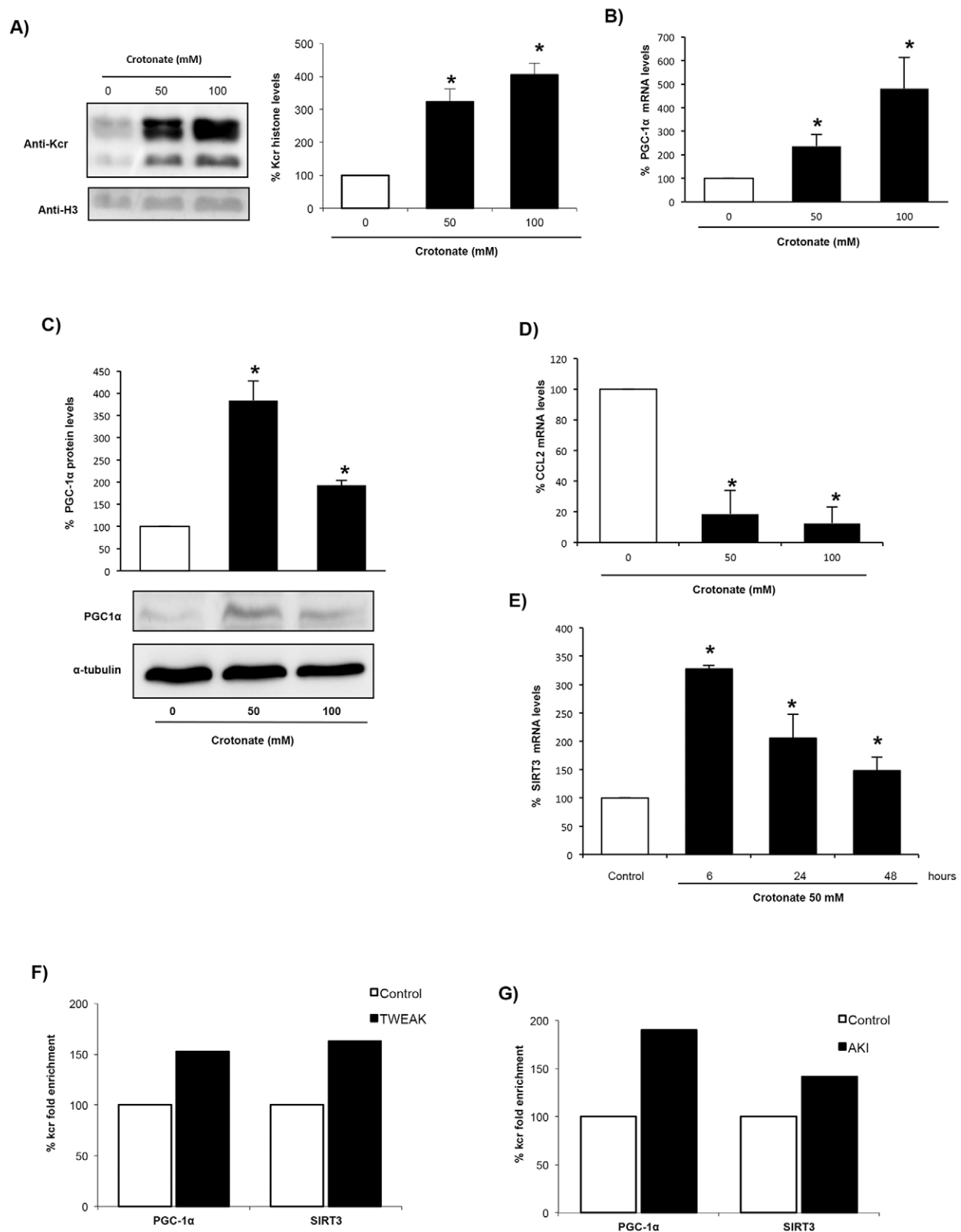


Fig. 3. Crotonate increases histone crotonylation and modifies gene expression in cultured proximal tubular epithelial cells. Cells were stimulated with 0, 50 or 100 mM crotonate for 24 h. (A) Quantification of histone crotonylation (anti-Kcr) and representative western blot. Mean \pm s.e.m. of three independent experiments; * P <0.05 vs 0 mM crotonate (non-parametric Mann–Whitney U -test). (B,D) PGC-1 α and CCL2 mRNA levels. Data from eight independent experiments expressed as mean \pm s.e.m. * P <0.05 vs control (Student's t -test). (C) PGC-1 α western blot of whole-cell extracts. Data from four independent experiments is expressed as mean \pm s.e.m. * P <0.05 vs control (non-parametric Mann–Whitney U -test). (E) SIRT3 mRNA levels in tubular cells exposed to 50 mM crotonate. Data from four independent experiments expressed as mean \pm s.e.m. * P <0.05 vs control (non-parametric Mann–Whitney U -test). (F,G) ChIP-seq analysis was performed using a pan anti-Kcr antibody in (F) tubular cells incubated with 100 ng/ml TWEAK for 6 h (data from three independent experiments) and (G) kidney tissue from mouse AKI (six animals per group). Results show the percentage of Kcr enrichment.

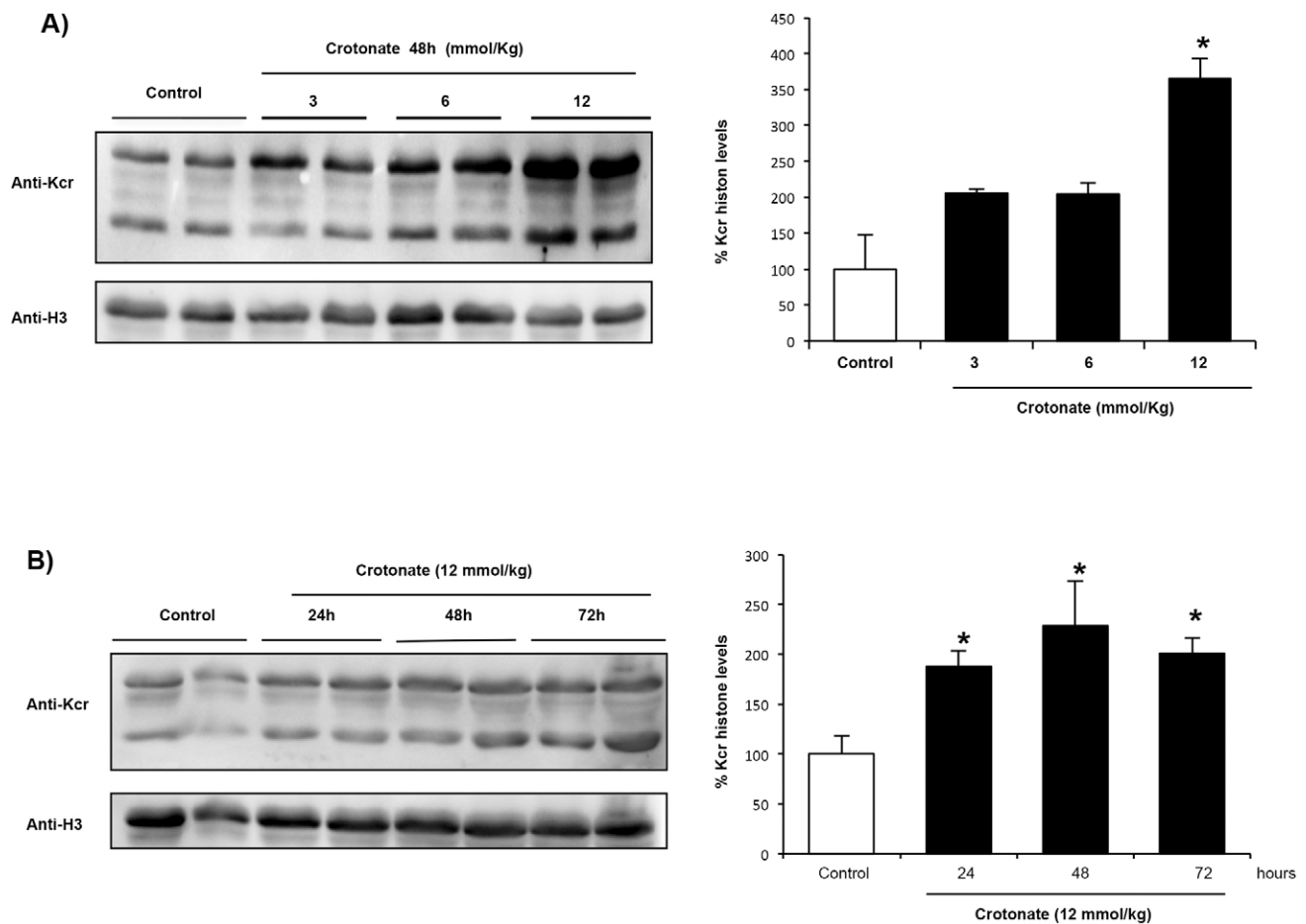


Fig. 4. Crotonate increases histone crotonylation in mouse kidney. Mice were treated with crotonate at different doses and for different times. Histone crotonylation was measured by western blotting (anti-Kcr). (A) Dose-response curve at 48 h. Mice received vehicle, or 3, 6 or 12 mmol/kg body weight crotonate by intraperitoneal injection. Mean±s.e.m. of four mice per group. * $P<0.05$ vs control (non-parametric Mann–Whitney U -test). (B) Timecourse curve. Mice were killed 24, 48 or 72 h following intraperitoneal injection of 12 mmol/kg body weight crotonate or vehicle (control). Mean±s.e.m. of four mice per group. * $P<0.05$ vs control (non-parametric Mann–Whitney U -test).

protected from injury and loss of renal function in AKI. The genes studied in the present manuscript were chosen as representative of upregulated and downregulated genes shared by both AKI and stressor-stimulated (i.e. TWEAK-stimulated) cultured tubular cells. Given that histone post-translational modifications might impact on the expression of multiple genes, it remains to be explored whether changes in the expression of these specific genes or other genes are the key drivers of the observed beneficial effect of crotonate.

We identified and characterized two interventions that increased overall histone crotonylation in kidney cells: cell stress by inflammatory cytokines or during AKI, and increasing the crotonate substrate availability. By contrast, direct cytotoxicity mediated by cisplatin in culture did not modulate histone crotonylation. However, both interventions had a differential effect on the expression of the studied genes. Thus, we identified two specific genes, PGC-1 α and SIRT3, which underwent increased histone crotonylation during AKI and in tubular cells stressed by TWEAK. Under stress conditions, the mRNA and protein levels of both genes were decreased, suggesting decreased transcription. One possible explanation is that increased histone crotonylation results in decreased gene transcription. However, increasing overall histone crotonylation by addition of crotonate increased the expression of PGC-1 α and SIRT3. Thus, alternative explanations should be

sought. One possibility is that the effect of histone crotonylation might be dependent on the context: within the increased crotonate substrate availability context, histone crotonylation could promote gene expression whereas under a proinflammatory or cell stress context, histone crotonylation might decrease expression of certain genes. In this regard, the same histone post-translational modification might be associated with increased or decreased gene expression depending on the gene and context (Bao et al., 2014; Sabari et al., 2015). Further studies should clarify this issue in the specific case of crotonylation. Up to now, higher levels of histone crotonylation at the promoters of genes activated by lipopolysaccharide, such as Il6, Gbp2, Ifit1 and Rsad2, have been associated with increased gene expression (Sabari et al., 2015). In this regard, an alternative potential explanation is that increased histone crotonylation at the genes encoding SIRT3 and PGC-1 α following cell stress might be a compensatory mechanism that limits the fall in gene expression, rather than the driver of gene suppression. Further studies are needed to unravel the role of histone crotonylation in the regulation of gene expression in different cellular contexts and for specific genes.

It has recently been reported that crotonate increases the intracellular crotonyl-CoA availability, thus stimulating gene transcription through p300 (also known as EP300)-catalyzed histone crotonylation (Sabari et al., 2015). In this regard, histone crotonylation can be catalyzed by either p300 or the p300-CREB-

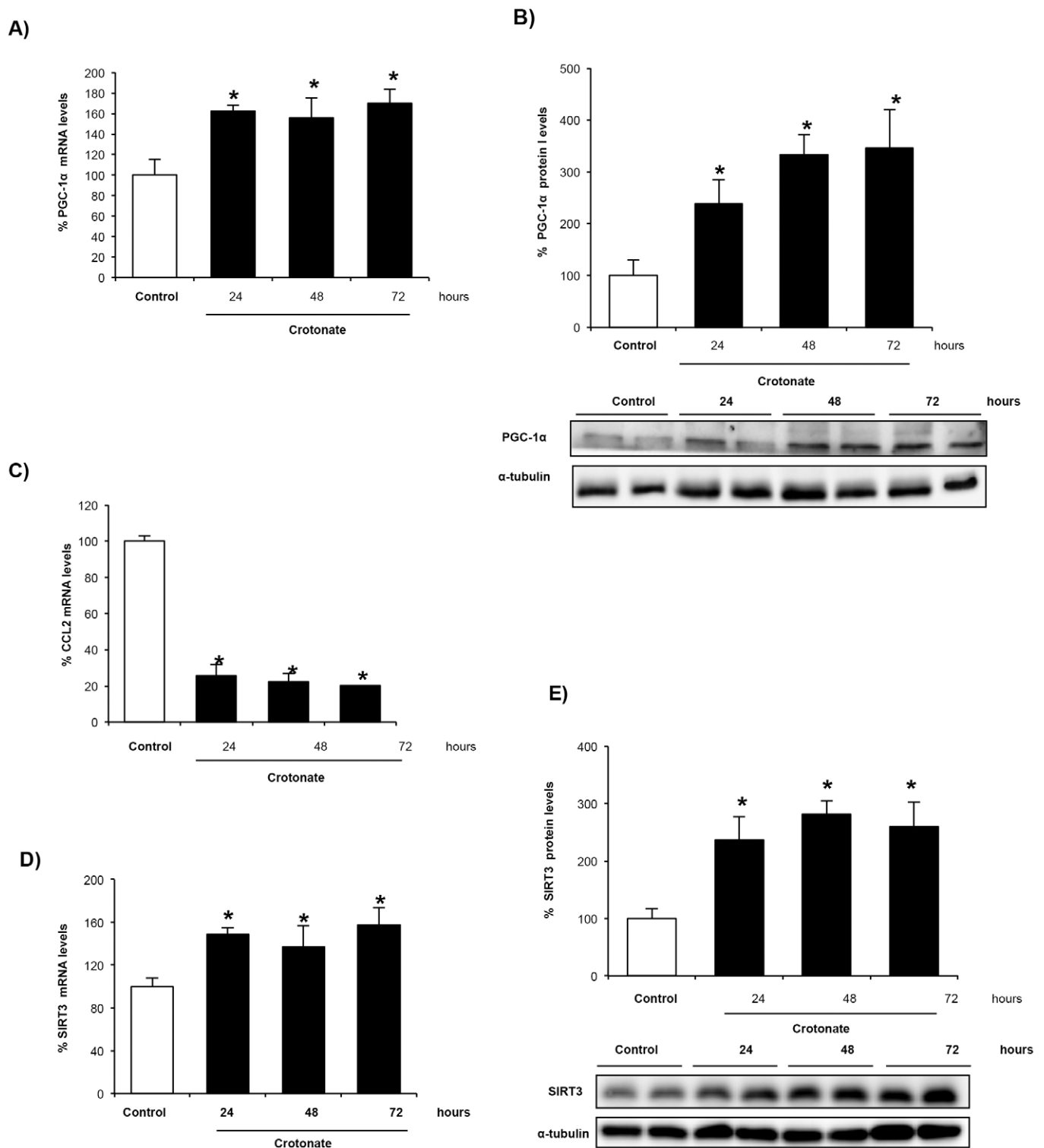


Fig. 5. Crotonate increases PGC-1 α and SIRT3 mRNA and decreases CCL2 mRNA expression in mouse kidney. Mice were treated with 12 mmol/kg body weight crotonate for different times. (A,B) Crotonate increases kidney PGC-1 α expression at mRNA levels as assessed by qRT-PCR (A) and at the protein level by western blotting (B). Mean \pm s.e.m. of four per group. * P < 0.05 vs control (non-parametric Mann–Whitney U -test). (C) Crotonate decreases whole kidney CCL2 mRNA levels as assessed by qRT-PCR. Mean \pm s.e.m. of four per group. * P < 0.05 vs control (non-parametric Mann–Whitney U -test). (D,E) Crotonate increases whole kidney SIRT3 mRNA levels as assessed by qRT-PCR (D) and the SIRT3 protein level as assessed by western blotting (E). Mean \pm s.e.m. of four per group. * P < 0.05 vs control (non-parametric Mann–Whitney U -test).

binding protein (CBP) complex (Sabari et al., 2015). Interestingly, SIRT3 and PGC-1 α regulate each other through CREB-mediated gene expression mechanisms (Shi et al., 2005; Palacios et al., 2009; Than et al., 2011; Giralt et al., 2011). Our results suggests that

crotonate, by increasing crotonyl-CoA availability, leads to increased histone crotonylation (Sabari et al., 2015), and increased gene transcription of SIRT3, that, in turn, acts as a decrotonylase. The increased expression of a decrotonylase in

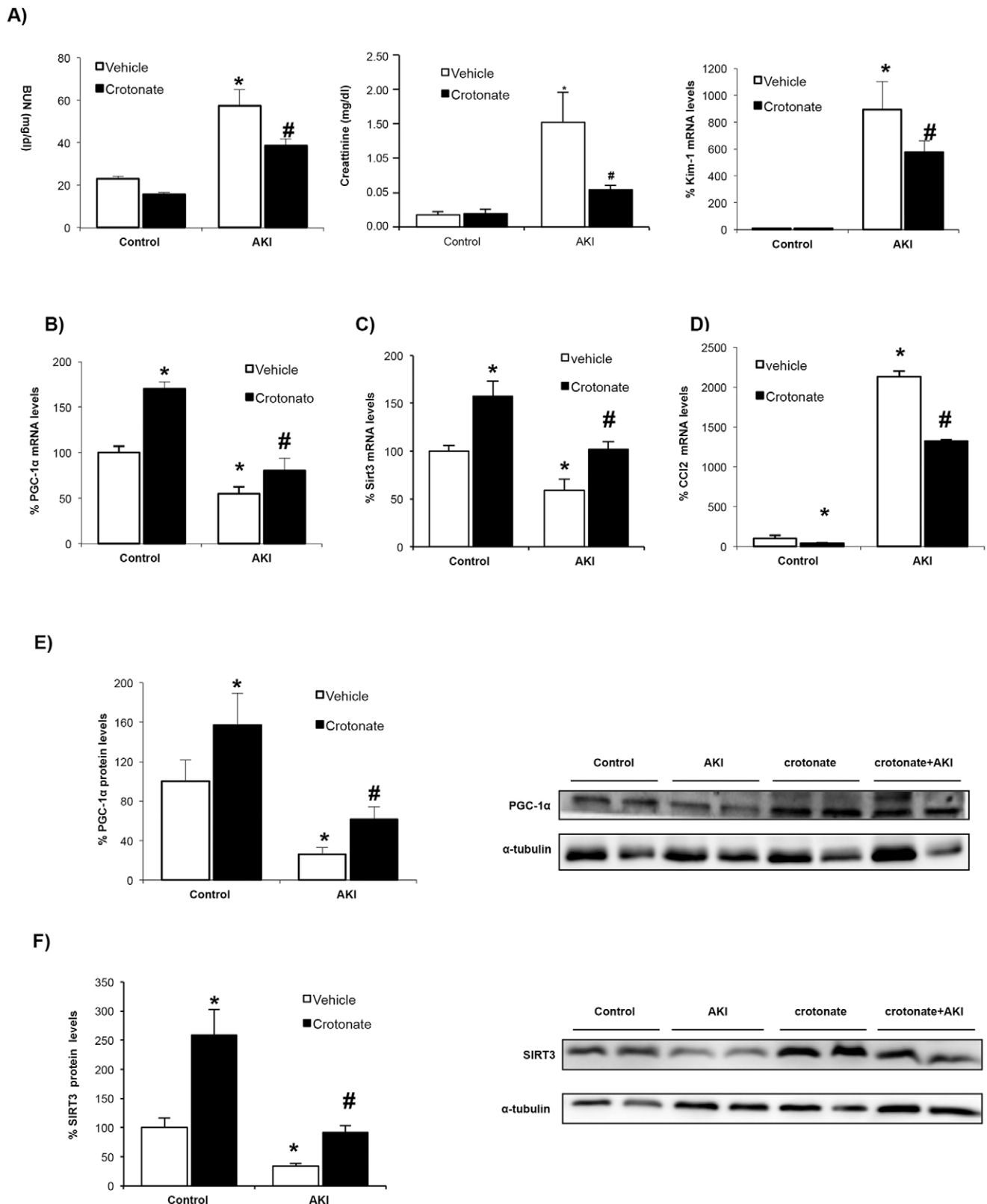


Fig. 6. Crotonate prevents downregulation of kidney PGC-1 α and SIRT3 as well as causing CCL2 upregulation in experimental AKI. AKI was induced by a folic acid overdose in mice pretreated with or without 12 mmol/kg body weight crotonate. All mice were killed at 72 h. (A) Crotonate prevented the increase in serum BUN and creatinine levels and in Kim-1 mRNA expression observed in AKI. Mean \pm s.e.m. of five mice per group. * P <0.05 vs vehicle control, # P <0.05 vs vehicle AKI (non-parametric Mann–Whitney U -test). (B–D) The kidney PGC-1 α mRNA decrease (B), SIRT3 mRNA decrease (C), and CCL2 mRNA increase (D) were prevented by pretreatment with crotonate. Mean \pm s.e.m. of five animals per group. * P <0.05 vs vehicle control, # P <0.05 vs vehicle AKI (non-parametric Mann–Whitney U -test). (E,F) Kidney PGC-1 α (E) and SIRT3 (F) protein levels decreased in AKI and this was prevented by pretreatment with crotonate. Western blot of whole kidney protein. Mean \pm s.e.m. of five animals per group. * P <0.05 vs vehicle control, # P <0.05 vs vehicle AKI (non-parametric Mann–Whitney U -test).

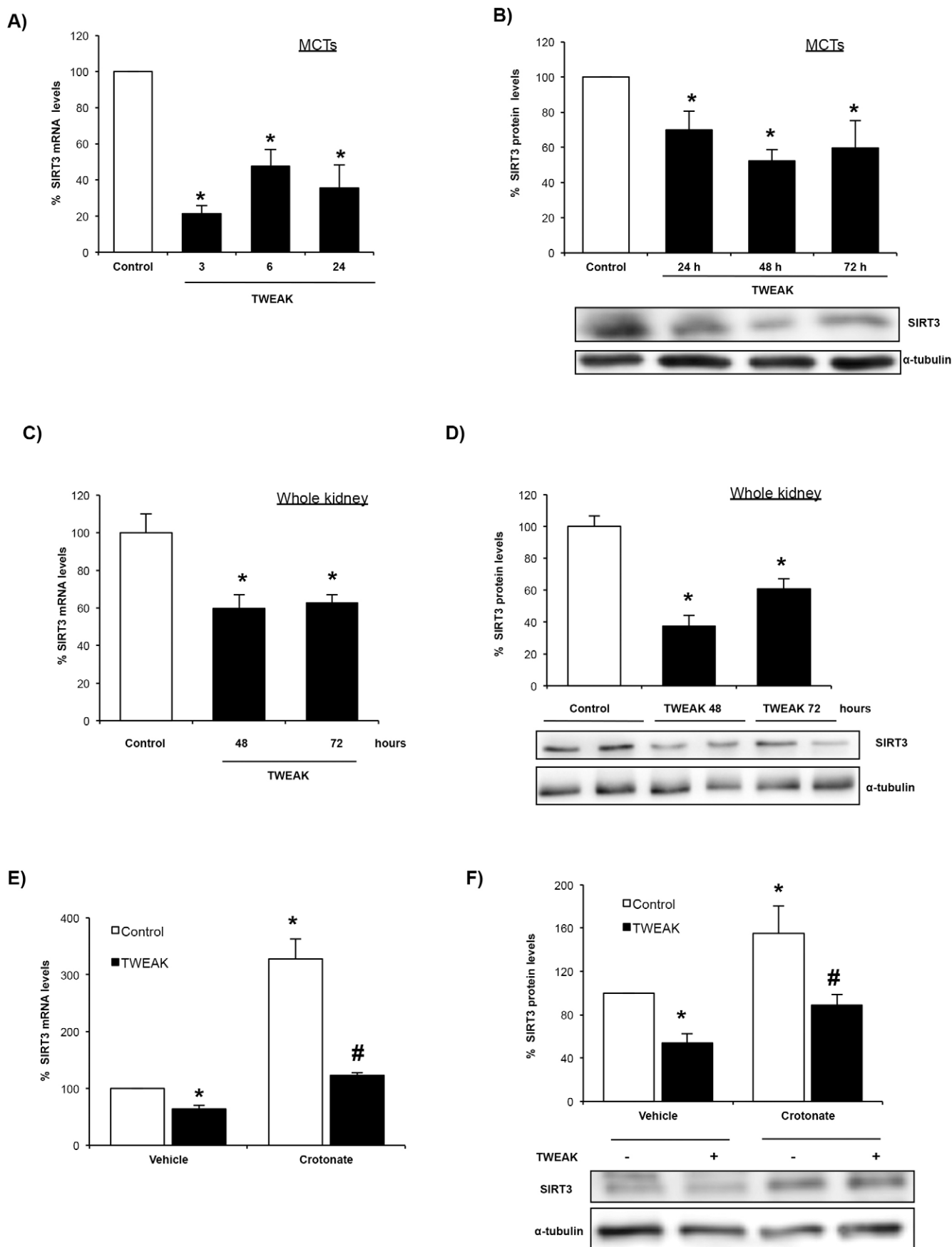


Fig. 7. See next page for legend.

Fig. 7. TWEAK downregulates SIRT3 in cultured tubular cells and this is prevented by crotonate. (A) SIRT3 mRNA levels in tubular cells incubated with 100 ng/ml TWEAK. Mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * P <0.05 vs control (non-parametric Mann–Whitney U -test). (B) Total protein levels of SIRT3 in MCT cells incubated with 100 ng/ml TWEAK for different periods of time. Mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * P <0.05 vs control (non-parametric Mann–Whitney U -test). (C) Kidney SIRT3 mRNA levels in mice treated with TWEAK. Mean \pm s.e.m. of five animals per group. * P <0.05 vs control (non-parametric Mann–Whitney U -test). (D) Kidney SIRT3 protein levels in mice treated with TWEAK for different times. Mean \pm s.e.m. of five animals per group. * P <0.05 vs control (non-parametric Mann–Whitney U -test). (E) SIRT3 mRNA levels were tested in tubular cells incubated with 100 ng/ml TWEAK with or without 50 mM crotonate for 6 h. Data from three independent experiments and expressed as mean \pm s.e.m. * P <0.05 vs vehicle control; # P <0.05 vs vehicle TWEAK (non-parametric Mann–Whitney U -test). (F) Total SIRT3 protein levels in tubular cells incubated with 100 ng/ml TWEAK with or without 50 mM crotonate for 48 h. Data from four independent experiments and expressed as mean \pm s.e.m. * P <0.05 vs vehicle control, # P <0.05 vs vehicle TWEAK (non-parametric Mann–Whitney U -test).

response to crotonate might be teleologically interpreted as the activation of a negative-feedback mechanism. Increased SIRT3 levels and histone crotonylation at the PGC-1 α gene might increase PGC-1 α levels, limiting cell injury in response to stress.

By contrast, under stress conditions, such as AKI or in tubular cells stressed by inflammatory cytokines (e.g. TWEAK), the decrease in

SIRT3 expression, and, potentially, in SIRT3 deacetylase activity, might lead to increased histone crotonylation, thus limiting the downregulation of protective genes such as PGC-1 α (Fig. 8). Thus, decreased SIRT3 expression might be an additional pathway leading to increased histone crotonylation in an inflammatory milieu. Further research should explore the changes of histone crotonylation in relation to the functional status of the cell, as well as identify changes in histone crotonylation for individual genes.

SIRT3 is the physiological deacetylase that antagonizes p300-mediated histone acetylation (Wang et al., 2012). Although sirtuins were initially described as NAD-dependent deacetylases (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000; Sauve et al., 2006), some sirtuins with weak deacetylase activity might have substrate specificity towards other acyl groups attached to lysine residues. For example, SIRT5 preferentially hydrolyzes malonyl and succinyl lysine (Jiang et al., 2013; Du et al., 2011; Peng et al., 2011), and SIRT6 can remove long chain fatty acyl groups from lysine residues (Jiang et al., 2013). More recently, SIRT1 to SIRT3 have been reported to behave as deacetylases, thus regulating histone crotonylation dynamics and gene transcription (Bao et al., 2014).

A staining pattern compatible with histone crotonylation was also observed in human kidney tissue, including diseased kidneys. Although we were not able to study early stages of human AKI, this observation supports the potential clinical relevance of the findings.

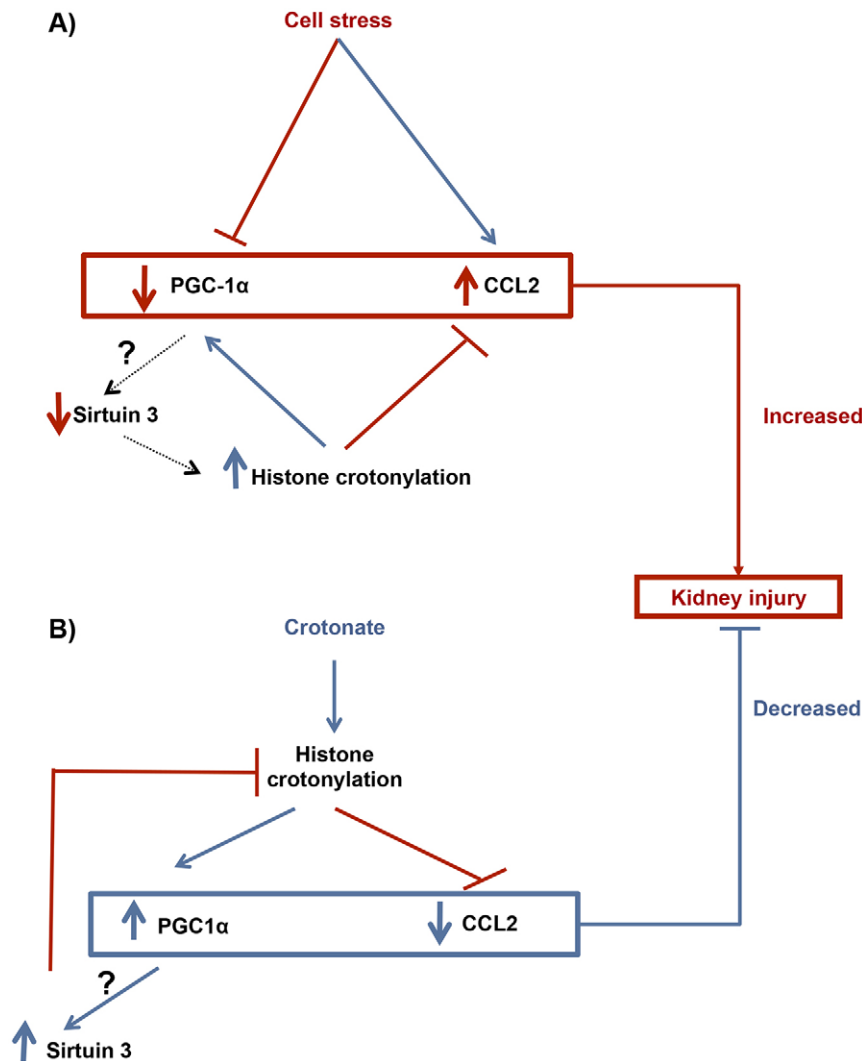


Fig. 8. Working hypothesis of histone lysine crotonylation in kidney injury. (A) Kidney cell stressors. Cell stressors, such as TWEAK, decrease PGC-1 α and increase CCL2 expression. These changes might contribute to tissue injury. We hypothesize that the decreased PGC-1 α expression might contribute to decreased expression of the crotonylase SIRT3 and, this, in turn, limits the decrease in PGC-1 α and SIRT3 expression by promoting histone crotonylation at the PGC-1 α and SIRT3 genes, as observed in cultured cells. (B) Therapeutic response to crotonate. Crotonate increased overall histone crotonylation and increased the expression of PGC-1 α and SIRT3, and decreased CCL2 expression. We hypothesize that these changes might contribute to the observed nephroprotection afforded by crotonate. The increased SIRT3 expression could, in turn, limit histone crotonylation as a negative-feedback mechanism.

In conclusion, for the first time we have shown that the pattern of histone crotonylation changes during AKI and in cultured tubular cells stressed by an inflammatory cytokine, suggesting a role of histone crotonylation in kidney injury. Furthermore, we have shown that the degree of kidney cell histone crotonylation might be manipulated therapeutically by administering crotonate, and that increasing overall histone crotonylation is nephroprotective. Although the precise mechanisms for the protective effect of crotonate remains to be further clarified, results reported here are consistent with the hypothesis that histone-crotonylation-mediated regulation of gene transcription plays a role. This is the first observation of the *in vivo* potential of the therapeutic manipulation of histone crotonylation in a disease state. Further studies are needed to define the role of histone crotonylation in additional models of kidney disease and in injury to other tissues.

MATERIALS AND METHODS

Cells and reagents

For *in vitro* experiments we used MCT murine proximal tubular epithelial cells. This cell line was originated from the kidneys of SJL mice in the University of Pennsylvania and obtained from Eric G. Neilson. Cells were authenticated and tested for mycoplasma contamination before use. MCT cells were cultured in RPMI 1640 with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin), in 5% CO₂ at 37°C. RPMI-1640, penicillin, streptomycin and trypsin-EDTA were from BioWhittaker (Waltham, MA) and FBS from Gibco (Carlsbad, CA) (Haverty et al., 1988). For experiments, cells were serum-depleted for 24 h, and then stimulated. Recombinant human TWEAK (Millipore, Billerica, MA) was used at 100 ng/ml unless otherwise specified, based on previously reported dose-response experiments in the same cells (Sanz et al., 2008b). Crotonate was used at 50 mM and 100 mM, based on previous studies on dynamics of histone lysine crotonylation in response to crotonate (Tan et al., 2011). Crotonic acid (Sigma) was dissolved in water at a concentration of 100 mg/ml to yield a clear, colorless solution. A 1 M stock solution in double-distilled H₂O was adjusted to neutral pH (pH 7.5) with sodium chloride. From this stock solution, the necessary dilutions were made in cell culture medium (RPMI-1640, Sigma). Following the same protocol, we used mannitol (Sigma), at concentrations equimolar to the crotonate concentrations used, as an osmolarity control in experiments *in vitro*. Mannitol is an inert molecule generally used as a osmolarity control for experimental conditions that increase osmolarity (e.g. during the study of the effects of high glucose concentration on cell biology). Cisplatin (Sigma) was used at concentrations of 50 and 100 µM.

RNA extraction and real-time PCR

Total RNA was extracted by the TRI Reagent method (Sigma) and 1 µg of RNA was reverse transcribed with the high capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). TaqMan Gene Expression Assays were from Applied Biosystems. Quantitative PCR was performed in a 7500 Real Time PCR System with the Prism 7000 System SDS Software (Applied Biosystems) and RNA expression was corrected to the GAPDH expression.

Western blotting

Cell samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40, 0.1 mM PMSF and 1 µg/ml pepstatin A) then separated by 10% SDS-PAGE under reducing conditions. After electrophoresis, samples were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad), blocked with 5% skimmed milk in PBS with 0.5% (v/v) Tween 20 for 1 h, washed with PBS with Tween, and incubated with mouse polyclonal anti-PGC-1α (1:1000, ST1202, Calbiochem) or rabbit polyclonal anti-SIRT3 (1:1000, #5490, Cell Signaling). Anti-PGC-1α was diluted in 5% milk PBS with Tween and anti-SIRT3 in 5% BSA in PBS with Tween. Blots were washed with PBS containing Tween and incubated with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1:2000, Amersham,

Aylesbury, UK). After washing with PBS containing Tween, blots were developed with the chemiluminescence method (ECL) (Amersham) using an ImageQuant LAS 400 system (GE Healthcare). Then, the images were analyzed with Quantity One software (Bio-Rad). Blots were then probed with mouse monoclonal anti-α-tubulin antibody (1:10,000, Sigma) and the levels of expression were corrected for differences in loading.

Histones were isolated using the epiQuik Total histone Extraction kit (Epigentek), and then separated by 10% SDS-PAGE under reducing conditions. After electrophoresis, samples were transferred to PVDF membranes (Millipore), blocked with 5% BSA in PBS with 0.5% (v/v) Tween 20 for 1 h, washed with PBS containing Tween, and incubated with rabbit polyclonal pan anti-crotonyl-lysine antibody (1:1000, PTM-501, PTM Biolabs) and anti-crotonyl-Histone H3 (Lys9) antibody (anti-H3K9, 1:1000, PTM-516, PTM Biolabs). Both antibodies were diluted in 5% BSA in PBS with Tween. Blots were then probed with rabbit polyclonal anti-histone H3 antibody (1:2000, #9715, Cell Signaling) after stripping with a buffer that removes primary and secondary antibodies from membranes (Yeung and Stanley, 2009). Anti-Kcr staining was normalized to anti-Histone H3 or Ponceau staining for each sample to correct for differences in loading. Then, the mean of the normalized control values was set at 100% and the normalized expression levels in other samples was expressed as a percentage change over control.

Animal models

All procedures were conducted in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Animal Ethics Committee of IIS-FJD. Folic acid nephropathy is a classical model of AKI (Sanz et al., 2008a; Ortega et al., 2006; Fang et al., 2005; Doi et al., 2006), which has been described in humans (Metz-Kurschel et al., 1990). Mice received a single intraperitoneal injection of 250 mg/kg body weight folic acid (Sigma) in 0.3 mol/l sodium bicarbonate or vehicle control and were killed at days 1, 3 or 7 (*n*=5 per day and group).

As a second model of AKI another set of mice (*n*=5 per group) was injected intraperitoneally with 20 mg/kg body weight cisplatin (Sigma) or vehicle (saline control) (Zhang et al., 2008). Mice were killed at 72 h. Nephrotoxicity is the dose-limiting side effect of the chemotherapeutic agent cisplatin in humans.

A further set of mice was injected intraperitoneally with crotonate. For dose-response experiments, mice received 3, 6 or 12 mmol/kg body weight crotonate (Sigma) or vehicle (saline control) and were killed at 48 h. For timecourse experiments, mice were injected intraperitoneally with 12 mmol/kg body weight crotonate or vehicle (saline control) (Hawkins et al., 1973; Lemieux et al., 1979; Lemieux et al., 1977) and killed at 24, 48 or 72 h (*n*=4 per group and time-point). Crotonate dose was calculated based on *in vitro* experiments for an extracellular volume of 6.5 ml/mouse and further refined by the dose-response studies. In another set of experiments, mice were pretreated with 12 mmol/kg body weight crotonate and 24 h later AKI was induced by folic acid injection and mice were killed at 72 h.

Kidneys were perfused *in situ* with cold saline before removal. One kidney was snap-frozen in liquid nitrogen for RNA and protein studies, and the other was fixed and embedded in paraffin. Blood was collected from the femoral vein before perfusion of the kidneys. For all the experiments, C57/BL6 mice of 12 to 14 weeks old were used.

For histological assessment, PAS-stained kidney sections were evaluated by an experienced pathologist blinded as to the nature of the samples, using a semiquantitative histological score on a 0 (normal) to 3 scale (severely affected) evaluating the following items: tubular cell injury, tubular cell regeneration, tubular atrophy, calcification, tubule dilatation, leukocyte casts and hyaline casts. For each mouse, the sum of the individual score for each item yielded the total score.

ChIP-seq

ChIP-seq for histone lysine crotonylation was carried out as previously described with 100 µg fractionated cell or kidney tissue chromatin and 5 µg anti-crotonyl-lysine antibody (Tan et al., 2011). ChIP-seq libraries for sequencing were prepared following Illumina protocols (Illumina, San Diego, CA) with minor modifications. Libraries for input samples were generated using 20 ng of corresponding input chromatin. Briefly, ChIPed DNA was first

blunted with an END-IT DNA repair kit (Epicenter Biotechnology, Madison, WI) and then incubated with Klenow fragment (3'→5' exo) (New England Biolabs, MA) and dATP to generate a single-base 3'-dA overhang. Illumina sequencing adapter was then ligated to the resulting DNA, followed by size selection (180–400 bp) on an 8% acrylamide gel. This size-selection step was repeated after PCR amplification with DNA primers (Illumina). Libraries were sequenced using Illumina GAI or HiSeq machine as per the manufacturer's protocols. Following sequencing cluster imaging, base calling was conducted using the Illumina pipeline. Reads were mapped to the mouse mm10 genome build with a bowtie software package. Total mapped tags were paired down to unique, monoclonal tags. These are tags that mapped to one location in the genome and each sequence is represented once.

Flow cytometry

A total of 10,000 cells were seeded in 12-well plates (Costar, Cambridge, MA) in RPMI with 10% FBS overnight and rested in serum-free medium for 24 h before crotonate addition. Thereafter, stimuli were added to subconfluent cells. For assessment of apoptosis by flow cytometry adherent cells were pooled with spontaneously detached cells, and incubated in 100 µg/ml propidium iodide, 0.05% NP-40 and 10 µg/ml RNase A in PBS at 4°C for >1 h. This assay permeabilizes the cells, thus the propidium iodide stains both living and dead cells. The percentage of apoptotic cells with decreased DNA staining (hypodiploid cells) was assessed by counting after flow cytometry using BD CellQuest Software (BD Biosciences) (Sanz et al., 2009; Justo et al., 2006; Lorz et al., 2000).

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Kidney tissue immunohistochemistry was performed as previously described (Hazzouri et al., 2000) in 3-µm thick sections of paraffin-embedded tissue using a PT-link device (with a low pH solution, 95°C, 20 min). Sections were washed with wash buffer for 5 min and blocked by incubation with PBS containing 5% milk for 30 min. For immunostaining, sections were incubated with anti-crotonyl-lysine antibody (PTM Biolabs) diluted at 1:250 in TBS 0.5% milk for 2 h, washed in TBS three times, incubated with biotinylated secondary antibody (1:2000 in PBS containing 0.5% milk) for 30 min, and washed and incubated with AB streptavidin complex. Then the slides were washed with TBS and final detection was performed using DAB (Dako Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Sections were counterstained with Carazzi's hematoxylin. Negative controls included incubation with isotype IgG. Immunohistochemistry was performed in five human kidney samples from the IIS-FJD Biobank, corresponding to males, aged 56 to 80 years, serum creatinine 0.7 to 1.7 mg/dl. Informed consent was obtained for all tissue donors and all clinical investigations have been conducted according to principles expressed in the Declaration of Helsinki.

For immunofluorescence, 10⁶ cells were seeded on coverslips in RPMI medium supplemented with 10% FBS and were serum starved for 24 h prior to experiments. Cells were washed with ice-cold PBS three times and fixed in neutral buffered 10% formalin (Sigma) in PBS for 20 min at room temperature. After three brief PBS rinses, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 min on ice followed by PBS rinses. Permeabilized cells were then blocked with 5% BSA in PBS for 30 min at room temperature and then incubated with pan anti-crotonyl-lysine antibody (PTM Biolabs) at 1:500 in PBS with 5% BSA at 4°C overnight, followed by incubation with Alexa-Fluor-488-conjugated goat anti-rabbit-IgG (1:300 in PBS with 5% BSA, Invitrogen) for 1 h at 37°C. Then cells were incubated with Alexa-Fluor-555-phalloidin (1:1500 in PBS with 5% BSA; Life Technologies) for 30 min at room temperature, counterstained with DAPI and mounted.

Statistics

Statistical analysis was performed using the SPSS 11.0 statistical software (Chicago, IL). Results are expressed as mean±s.e.m. Significant differences between mean values were determined with the Mann–Whitney *U*-test for comparison of two groups or paired Student's *t*-test if appropriate (normal distribution and *n*≥5). Two-tailed test values of *P*<0.05 were considered significant. For small samples sizes (*n*<5), a nonparametric Mann–Whitney *U*-test was assessed.

Acknowledgements

We greatly appreciate the willingness of Bing Ren to share his unique thoughts and experiences in ChIP-seq.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

O.R.-A. contributed to the design of the experiments, acquisition, analysis and interpretation of all data, writing and drafting of the manuscript. P.C.-O. provided paraffin-embedded human tissue and histopathology studies of stained kidney sections. M.D.S.-N. and M.R.-O. contributed to the critical review of the manuscript before submission and to the design of the study. J.E. contributed to critical review of the manuscript before submission and financial support of the study. A.O. and A.B. S. contributed to the design of experiments, analysis and interpretation of the data, writing the manuscript and financial support of the experiments. All the authors reviewed the manuscript and approved the final version to be published.

Funding

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [grant numbers PI13/00047, PIE13/00051, PI14/00386, PI15/00298, CP12/03262, CP14/00133, RETIC REDinREN RD12/0021]; the European Regional Development Funds [Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)]; European Uremic Toxin (EUTox) Work Group of the ESAO; the Sociedad Española de Nefrología (SEN) [9749/002]; Comunidad de Madrid (CIFRA) [grant number S2010/BMD-2378]; and Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT) [9749/001]. Salary support was provided by ISCIII Miguel Servet MS12/03262 and MS14/00133 to A.B.S. and M.D.S.-N., MECD to O.R.-A. and programa Intensificación Actividad Investigadora (ISCIII/Agencia Laín-Entralgo/CM) to A.O. IIS-FJD Biobank RD09/0076/00101.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://dmm.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dmm.024455/-DC1>

References

- Baek, J.-H., Zeng, R., Weinmann-Menke, J., Valerius, M. T., Wada, Y., Ajay, A. K., Colonna, M. and Kelley, V. R. (2015). IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease. *J. Clin. Invest.* **125**, 3198–3214.
- Bao, X., Wang, Y., Li, X., Li, X.-M., Liu, Z., Yang, T., Wong, C. F., Zhang, J., Hao, Q. and Li, X. D. (2014). Identification of 'erasers' for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach. *Elife* **3**, e02999.
- Bell, E. L. and Guarente, L. (2011). The SirT3 divining rod points to oxidative stress. *Mol. Cell* **42**, 561–568.
- Berdasco, M. and Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev. Cell* **19**, 698–711.
- Berger, K. and Moeller, M. J. (2014). Mechanisms of epithelial repair and regeneration after acute kidney injury. *Semin. Nephrol.* **34**, 394–403.
- Doi, K., Okamoto, K., Negishi, K., Suzuki, Y., Nakao, A., Fujita, T., Toda, A., Yokomizo, T., Kita, Y., Kihara, Y. et al. (2006). Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *Am. J. Pathol.* **168**, 1413–1424.
- Du, J., Zhou, Y., Su, X., Yu, J. J., Khan, S., Jiang, H., Kim, J., Woo, J., Kim, J. H., Choi, B. H. et al. (2011). Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science* **334**, 806–809.
- Fang, T.-C., Alison, M. R., Cook, H. T., Jeffery, R., Wright, N. A. and Poulosom, R. (2005). Proliferation of bone marrow-derived cells contributes to regeneration after folic acid-induced acute tubular injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 1723–1732.
- Gajjala, P. R., Fliser, D., Speer, T., Jankowski, V. and Jankowski, J. (2015). Emerging role of post-translational modifications in chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, 1814–1824.
- García-Cenador, M. B., Lorenzo-Gomez, M. F., Herrero-Payo, J. J., Ruiz, J., Perez De Obanos, M. P., Pascual, J., Lopez-Novoa, J. M. and Garcia-Criado, F. J. (2013). Cardiotrophin-1 administration protects from ischemia-reperfusion renal injury and inflammation. *Transplantation* **96**, 1034–1042.
- Giralt, A., Hondares, E., Villena, J. A., Ribas, F., Díaz-Delfín, J., Giralt, M., Iglesias, R. and Villarroya, F. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype. *J. Biol. Chem.* **286**, 16958–16966.
- Haverty, T. P., Kelly, C. J., Hines, W. H., Amenta, P. S., Watanabe, M., Harper, R. A., Kefalides, N. A. and Neilson, E. G. (1988). Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J. Cell Biol.* **107**, 1359–1368.
- Hawkins, R. A., Houghton, C. R. S. and Williamson, D. H. (1973). Hepatic redox state and gluconeogenesis from lactate in vivo in the rat. *Biochem. J.* **132**, 19–25.
- Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A.-K., Usson, Y., Pelletier, R., Sèle, B., Khochbin, S. and Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core

- histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 950-960.
- Huang, J.-Y., Hirsche, M. D., Shimazu, T., Ho, L. and Verdin, E. (2010). Mitochondrial sirtuins. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1645-1651.
- Imai, S.-I., Armstrong, C. M., Kaerberlein, M. and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800.
- Iwahara, T., Bonasio, R., Narendra, V. and Reinberg, D. (2012). SIRT3 functions in the nucleus in the control of stress-related gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 5022-5034.
- Izquierdo, M. C., Sanz, A. B., Mezzano, S., Blanco, J., Carrasco, S., Sanchez-Niño, M. D., Benito-Martín, A., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. and Ortiz, A. (2012). TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int.* **81**, 1098-1107.
- Jiang, H., Khan, S., Wang, Y., Charron, G., He, B., Sebastian, C., Du, J., Kim, R., Ge, E., Mostoslavsky, R. et al. (2013). SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* **496**, 110-113.
- Justo, P., Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Winkles, J. A., Lorz, C., Egido, J. and Ortiz, A. (2006). Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK. *Kidney Int.* **70**, 1750-1758.
- Kong, X., Wang, R., Xue, Y., Liu, X., Zhang, H., Chen, Y., Fang, F. and Chang, Y. (2010). Sirtuin 3, a new target of PGC-1 α , plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS ONE* **5**, e11707.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L. and Sternglanz, R. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5807-5811.
- Lemieux, G., Vinay, P., Gougoux, A., Baverel, G. and Cartier, P. (1977). Relationship between the renal metabolism of glutamine, fatty acids and ketone bodies. *Curr. Probl. Clin. Biochem.* **8**, 379-388.
- Lemieux, G., Baverel, G., Vinay, P. and Gougoux, A. (1979). Effect of fluoroacetate on the inhibitory action of ketone bodies and fatty acids on renal ammoniogenesis. *Am. J. Physiol.* **237**, F7-F13.
- Linkermann, A., Stockwell, B. R., Krautwald, S. and Anders, H.-J. (2014). Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 759-767.
- Lorz, C., Ortiz, A., Justo, P., González-Cuadrado, S., Duque, N., Gómez-Guerrero, C. and Egido, J. (2000). Proapoptotic Fas ligand is expressed by normal kidney tubular epithelium and injured glomeruli. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 1266-1277.
- Metz-Kurschel, U., Kurschel, E., Wagner, K., Aulbert, E., Graben, N. and Philipp, T. (1990). Folate nephropathy occurring during cytotoxic chemotherapy with high-dose folinic acid and 5-fluorouracil. *Ren. Fail.* **12**, 93-97.
- Munro, S. K., Mitchell, M. D. and Ponnampalam, A. P. (2013). Histone deacetylase inhibition by trichostatin A mitigates LPS induced TNF α and IL-10 production in human placental explants. *Placenta* **34**, 567-573.
- Nakamura, Y., Ogura, M., Tanaka, D. and Inagaki, N. (2008). Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 174-179.
- Ortega, A., Rámila, B., Ardura, J. A., Esteban, V., Ruiz-Ortega, M., Barat, A., Gazapo, R., Bosch, R. J. and Esbrit, P. (2006). Role of parathyroid hormone-related protein in tubulointerstitial apoptosis and fibrosis after folic acid-induced nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1594-1603.
- Ortiz, A., Sanchez-Niño, M. D., Izquierdo, M. C., Blanco-Colio, L. M., Selgas, R., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. and Sanz, A. B. (2011). TWEAK and the kidney: the dual role of a multifunctional cytokine. *Adv. Exp. Med. Biol.* **691**, 323-335.
- Palacios, O. M., Carmona, J. J., Michan, S., Chen, K. Y., Manabe, Y., Ward, J. L., III, Goodyear, L. J. and Tong, Q. (2009). Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 α in skeletal muscle. *Aging* **1**, 771-783.
- Peng, C., Lu, Z., Xie, Z., Cheng, Z., Chen, Y., Tan, M., Luo, H., Zhang, Y., He, W., Yang, K. et al. (2011). The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.012658.
- Ruiz-Andres, O., Suarez-Alvarez, B., Sánchez-Ramos, C., Monsalve, M., Sanchez-Niño, M. D., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., Ortiz, A. and Sanz, A. B. (2015). The inflammatory cytokine TWEAK decreases PGC-1 α expression and mitochondrial function in acute kidney injury. *Kidney Int.* [EPub]
- Sabari, B. R., Tang, Z., Huang, H., Yong-Gonzalez, V., Molina, H., Kong, H. E., Dai, L., Shimada, M., Cross, J. R., Zhao, Y. et al. (2015). Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation. *Mol. Cell* **58**, 203-215.
- Sanz, A. B., Justo, P., Sanchez-Niño, M. D., Blanco-Colio, L. M., Winkles, J. A., Krezler, M., Jakubowski, A., Blanco, J., Egido, J., Ruiz-Ortega, M. et al. (2008a). The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 695-703.
- Sanz, A. B., Sánchez-Niño, M. D., Izquierdo, M. C., Moreno, J. A., Ucerro, A. C., Benito-Martín, A., Santamaría, B., Burgos, C., Egido, J., Ramos, A. et al. (2008b). [TWEAK, the facilitator of acute kidney injury]. *Nefrología* **28**, 587-592.
- Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Izquierdo, M. C., Jakubowski, A., Justo, P., Blanco-Colio, L. M., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. and Ortiz, A. (2009). Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: a role in uninephrectomy induced renal hyperplasia. *J. Cell Mol. Med.* **13**, 3329-3342.
- Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Izquierdo, M. C., Jakubowski, A., Justo, P., Blanco-Colio, L. M., Ruiz-Ortega, M., Selgas, R., Egido, J. and Ortiz, A. (2010a). TWEAK activates the non-canonical NF κ B pathway in murine renal tubular cells: modulation of CCL21. *PLoS ONE* **5**, e8955.
- Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Ramos, A. M., Moreno, J. A., Santamaría, B., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. and Ortiz, A. (2010b). NF- κ B in renal inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1254-1262.
- Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D. and Ortiz, A. (2011). TWEAK, a multifunctional cytokine in kidney injury. *Kidney Int.* **80**, 708-718.
- Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L. and Boeke, J. D. (2006). The biochemistry of sirtuins. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 435-465.
- Scher, M. B., Vaquero, A. and Reinberg, D. (2007). SirT3 is a nuclear NAD $^{+}$ -dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev.* **21**, 920-928.
- Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D. and Hake, S. B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nat. Protoc.* **2**, 1445-1457.
- Shi, T., Wang, F., Stieren, E. and Tong, Q. (2005). SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 13560-13567.
- Sundaresan, N. R., Samant, S. A., Pillai, V. B., Rajamohan, S. B. and Gupta, M. P. (2008). SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6384-6401.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N. et al. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146**, 1016-1028.
- Than, T. A., Lou, H., Ji, C., Win, S. and Kaplowitz, N. (2011). Role of cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-regulated transcription coactivator 3 (CRT3) in the initiation of mitochondrial biogenesis and stress response in liver cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 22047-22054.
- Tran, M., Tam, D., Bardia, A., Bhasin, M., Rowe, G. C., Kher, A., Zsengeller, Z. K., Akhavan-Sharif, M. R., Khankin, E. V., Saintgeniez, M. et al. (2011). PGC-1 α promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 4003-4014.
- Van Beneden, K., Geers, C., Pauwels, M., Mannaerts, I., Verbeelen, D., Van Grunsven, L. A. and Van Den Branden, C. (2011). Valproic acid attenuates proteinuria and kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1863-1875.
- Van Beneden, K., Geers, C., Pauwels, M., Mannaerts, I., Wissing, K. M., Van Den Branden, C. and Van Grunsven, L. A. (2013). Comparison of trichostatin A and valproic acid treatment regimens in a mouse model of kidney fibrosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **271**, 276-284.
- Wang, Z., Inuzuka, H., Zhong, J., Liu, P., Sarkar, F. H., Sun, Y. and Wei, W. (2012). Identification of acetylation-dependent regulatory mechanisms that govern the oncogenic functions of Skp2. *Oncotarget* **3**, 1294-1300.
- Yeung, Y.-G. and Stanley, E. R. (2009). A solution for stripping antibodies from polyvinylidene fluoride immunoblots for multiple reprobing. *Anal. Biochem.* **389**, 89-91.
- Zhang, B., Ramesh, G., Uematsu, S., Akira, S. and Reeves, W. B. (2008). TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 923-932.

The inflammatory cytokine TWEAK decreases PGC-1 α expression and mitochondrial function in acute kidney injury

Olga Ruiz-Andres^{1,2}, Beatriz Suarez-Alvarez^{1,2}, Cristina Sánchez-Ramos³, Maria Monsalve³, Maria D. Sanchez-Niño^{1,2}, Marta Ruiz-Ortega^{1,2,4}, Jesús Egido^{1,4,5}, Alberto Ortiz^{1,2,4,5} and Ana B. Sanz^{1,2}

¹Laboratory of Nephrology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; ²REDinREN, Madrid, Spain; ³Department of Metabolism and Cellular Signaling, Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols' (CSIC-UAM), Madrid, Spain; ⁴School of Medicine, UAM, Madrid, Spain and ⁵IRSIN, Madrid, Spain

Studies of mitochondria-targeted nephroprotective agents suggest a key role of mitochondrial injury in AKI. Here we tested whether an improved perception of factors responsible for mitochondrial biogenesis may provide clues to novel therapeutic approaches to AKI. TWEAK is an inflammatory cytokine which is upregulated in AKI. Transcriptomic analysis of TWEAK-stimulated cultured murine tubular epithelial cells and folic acid-induced AKI in mice identified downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) and its target genes (mitochondrial proteins *Ndufs1*, *SdhA*, and *Tfam*) as a shared feature. Neutralizing anti-TWEAK antibodies prevented the decrease in kidney PGC-1 α and its targets during AKI. TWEAK stimulation decreased kidney PGC-1 α expression in healthy mice and decreased expression of PGC-1 α and its targets as well as mitochondrial membrane potential in cultured tubular cells. Adenoviral-mediated PGC-1 α overexpression prevented TWEAK-induced downregulation of PGC-1 α -dependent genes and the decrease in mitochondrial membrane potential. TWEAK promoted histone H3 deacetylation at the murine PGC-1 α promoter. TWEAK-induced downregulation of PGC-1 α was prevented by histone deacetylase or NF- κ B inhibitors. Thus, TWEAK decreases PGC-1 α and target gene expression in tubular cells *in vivo* and *in vitro*. Approaches that preserve mitochondrial function during kidney injury may be therapeutic for AKI.

Kidney International advance online publication, 4 November 2015; doi:10.1038/ki.2015.332

KEYWORDS: acute kidney injury; epigenetics; inflammation; mitochondria; tubular cell

Acute kidney injury (AKI) is a syndrome characterized by an acute, usually transient decrease in the kidney function resulting from kidney damage.¹ AKI is associated with high mortality and accelerated progression of chronic kidney disease.² The incidence of AKI is increasing as a consequence of a more fragile aging population and the existence of a consensus definition of AKI.² Currently, there is no satisfactory therapy to prevent progression or accelerate recovery from AKI.^{1,3} In recent years, functional interventional evidence has emerged of a key role of mitochondrial biology in AKI.⁴ Several mitochondria-targeted nephroprotective agents have been successfully tested in experimental AKI, and clinical trials are ongoing.⁴ An improved understanding of the molecular regulation of mitochondrial biogenesis may provide clues to design novel therapeutic approaches to kidney injury.

PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) is a member of a small family of transcriptional regulators that controls the expression of genes involved in energy homeostasis, mitochondrial biogenesis, fatty acid oxidation, and glucose metabolism. PGC-1 α is pivotal for the mitochondrial function, as well as for the expression of key mitochondrial proteins.⁵ PGC-1 α downregulation has been observed in different experimental models of AKI,^{6,7} and it is implicated as a causative event in renal functional impairment during sepsis-associated AKI.⁸ During sepsis kidney PGC-1 α expression is suppressed in proportion to the degree of organ dysfunction and rises back to preinjury levels as the function normalizes.⁸ However, sepsis is a specific form of AKI, in which dysfunction is disproportionate in relation to morphological histological injury. Thus, we have now explored experimental folic acid nephropathy, a model of renal injury, that shares with human AKI the development of extensive cell death, interstitial inflammatory infiltrates, and tubular cell proliferation that restores tubular cell mass.⁹ In both folic acid-induced and ischemia-reperfusion AKI, functional interventional studies have disclosed a key role of TWEAK.^{9,10} TWEAK is a tumor necrosis factor (TNF) superfamily cytokine that promotes

Correspondence: Ana B. Sanz, Laboratory of Nephrology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain.
E-mail: asanz@fjd.es

Received 23 May 2015; revised 3 September 2015; accepted 10 September 2015

kidney injury in the setting of AKI, immune-mediated glomerular injury, and nonimmune proteinuric kidney disease.^{9,11,12} An ongoing clinical trial is exploring nephroprotection by neutralizing anti-TWEAK antibodies in human lupus nephritis.¹³ However, much remains to be understood of the molecular mechanisms of nephroprotection resulting from TWEAK neutralization, and unraveling these pathways may help design novel nephroprotective therapeutic strategies.

TNF superfamily members may contribute to tissue injury by activating the transcription factor nuclear factor (NF)- κ B.¹⁴ Unlike TNF α , the best-characterized member of the cytokine superfamily, TWEAK activates both canonical and noncanonical NF- κ B signaling.^{15,16} Thus, TWEAK functions may be distinct from those of TNF α .¹⁵ It was recently reported that PGC-1 α downregulation mediates the deleterious effects of TWEAK in cardiac disease and in skeletal muscle atrophy. Indeed, TWEAK decreased PGC-1 α expression in cardiomyocytes and skeletal muscle.^{17,18} In kidney cells, TWEAK activation of NF- κ B not only leads to increased expression of inflammatory genes but also to decreased expression of nephroprotective genes such as Klotho.^{19,20} As PGC-1 α appears to have a role in renal protection, we hypothesized that TWEAK may also downregulate PGC-1 α expression in kidney cells. We took advantage of transcriptomics studies of experimental AKI and of TWEAK-stimulated tubular cells to search for mitochondrial biogenesis regulatory genes that were coordinately regulated by AKI and by TWEAK. This transcriptomics approach may identify TWEAK targets that may be relevant for the nephroprotective effect of anti-TWEAK-neutralizing antibodies. We found that TWEAK decreased the expression of PGC-1 α in tubular cells both in culture and *in vivo* and that TWEAK targeting preserved PGC-1 α in AKI. Moreover, decreased PGC-1 α expression was associated with decreased expression of PGC-1 α -dependent genes encoding mitochondrial proteins. Both NF- κ B activation and histone deacetylation contributed to decrease PGC-1 α in response to TWEAK.

RESULTS

TWEAK downregulates PGC-1 α in AKI

The mechanisms that regulate PGC-1 α expression during renal injury were explored in an established mouse model of AKI induced by a folic acid overdose. In this model, renal injury and loss of renal function are associated with interstitial inflammation and tubular injury.⁹ A kidney transcriptomic analysis showed reduced kidney PGC-1 α mRNA in AKI at 24 h compared with healthy mice (AKI/healthy kidney ratio 0.623 ± 0.497 ; $P < 0.01$; false discovery rate 0.02).²¹ Real time-PCR confirmed a significant decrease in PGC-1 α mRNA levels at 24 and 72 h after injury (Figure 1a). There was a negative correlation between PGC-1 α mRNA and blood urea nitrogen levels, a marker that increases with severity of AKI (Figure 1b). At day 7, PGC-1 α mRNA levels had been restored (Figure 1a), similar to renal function (Supplementary Figure S1A online). As TWEAK modulates PGC-1 α expression in nonrenal cells,¹⁷ we explored the role

of TWEAK in regulating PGC-1 α expression in AKI. The TWEAK receptor Fn14 was significantly upregulated in AKI, where it localized to tubular cells (Figure 1c and Supplementary Figure S2 online) and Fn14 expression positively correlated with blood urea nitrogen (Figure 1d) and negatively correlated with PGC-1 α expression (Figure 1e). We previously observed that neutralizing anti-TWEAK antibodies prevented renal dysfunction at 72 h in folic acid-induced AKI^{9,12} (Supplementary Figure S1B online). We have now observed that neutralizing anti-TWEAK antibodies prevented the decrease in PGC-1 α mRNA and protein expression 72 h after injury (Figure 1f–h). In contrast, neutralizing anti-TWEAK antibodies did not significantly improve early kidney dysfunction (Supplementary Figure S3A online) and did not prevent PGC-1 α downregulation at 24 h after injury (Supplementary Figure S3B online). This result suggests that TWEAK may contribute to amplify and promote persistence of renal injury through PGC-1 α downregulation.

Suppression of mitochondrial gene transcripts during AKI

The transcriptome of folic acid-induced AKI shows downregulation of PGC-1 α -dependent gene transcripts encoding mitochondrial proteins (Table 1). In addition, the transcriptome of cultured murine renal tubular cells treated with 100 ng/ml TWEAK for 6 h also showed downregulation of PGC-1 α mRNA (TWEAK/control ratio 0.583 ± 0.072 ; $*P < 0.004$; false discovery rate 0.09) and PGC-1 α targets genes (Table 1). Comparison of both transcriptomes identified three mitochondrial protein-encoding genes that were downstream of PGC-1 α and significantly downregulated in both conditions, *Ndufs1*, *Sdha*, and *Tfam*, encoding NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, succinate dehydrogenase complex subunit A flavoprotein (Fp), and mitochondrial transcription factor A, respectively (Table 1).^{8,22} These genes were selected for further studies. We confirmed downregulation of PGC-1 α , *Ndufs1*, *Sdha*, and *Tfam* mRNA during AKI by reverse transcriptase-PCR (Figure 2a) and observed a positive correlation of PGC-1 α expression with the expression of these PGC-1 α target genes during AKI (Figure 2b). Finally, neutralizing anti-TWEAK antibodies prevented the decreased mRNA expression of PGC-1 α targets during AKI (Figure 2c). These results suggest that during AKI, downregulation of PGC-1 α could lead to impairment of the mitochondrial function through downregulation of PGC-1 α targets genes, and this is dependent on TWEAK.

Exogenous TWEAK decreases renal PGC-1 α expression *in vivo*

TWEAK blockade prevented downregulation of renal PGC-1 α expression in AKI, but this could be a direct effect or an indirect consequence of improved tissue injury. Thus, we explored whether TWEAK directly regulated kidney PGC-1 α expression in healthy kidneys *in vivo*. Systemic injection of TWEAK decreased renal PGC-1 α mRNA levels *in vivo* at 48 and 72 h (Figure 3a). Moreover, TWEAK also decreased PGC-1 α protein levels *in vivo* as assessed by western blot (Figure 3b and c).

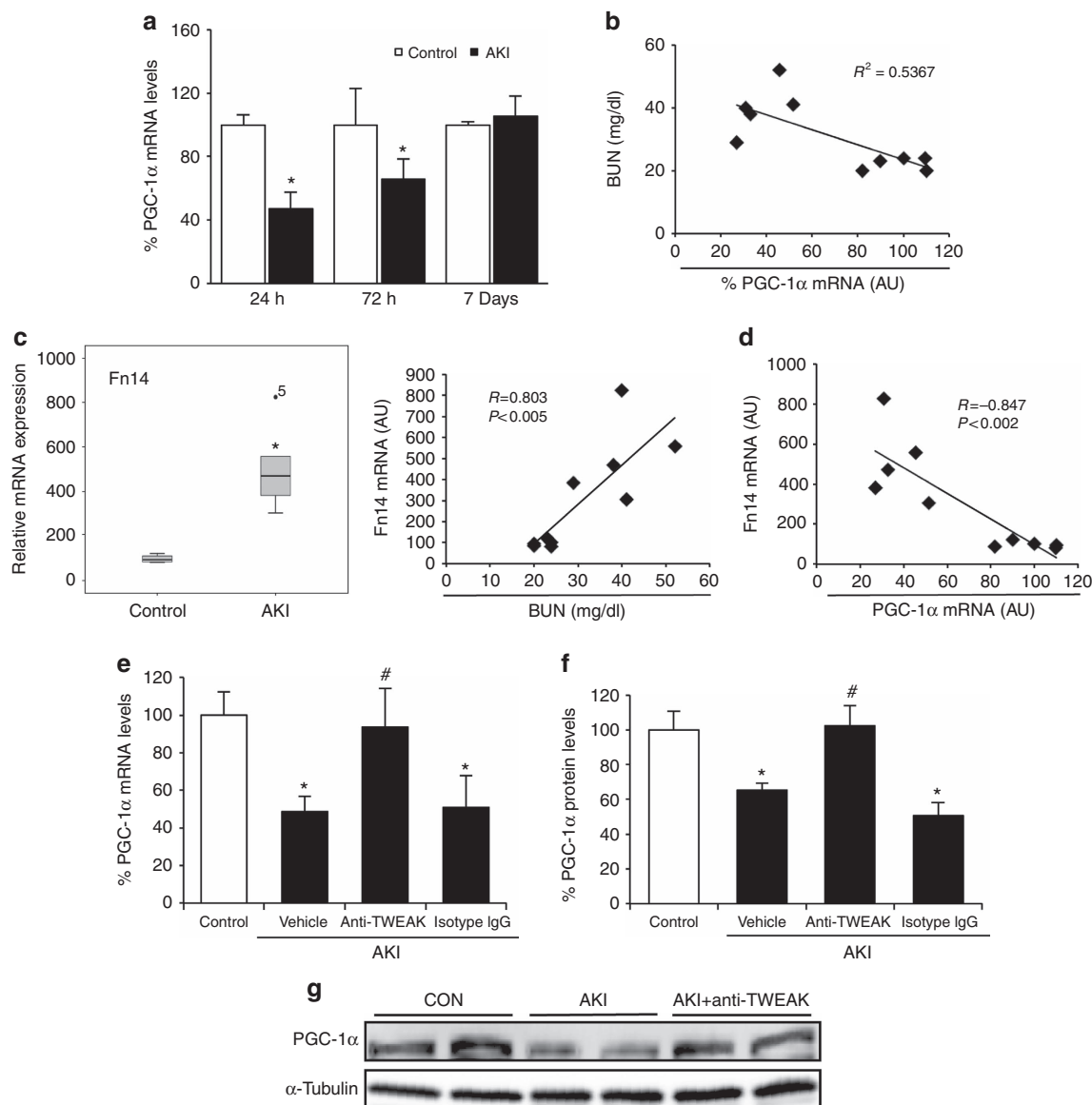


Figure 1 | TWEAK neutralization prevented PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) downregulation during acute kidney injury (AKI). (a) Kidney PGC-1 α mRNA expression was assessed by real-time quantitative real time-PCR (qRT-PCR) in mice with AKI induced by a folic acid overdose or controls at different periods of time. Mean \pm s.e.m. of five animals per group. * P < 0.02 versus control. (b) Scatter plot showing the significant negative correlation between kidney mRNA expression of PGC-1 α and serum blood urea nitrogen (BUN) levels in AKI at 72 h (n = 10). (c) Fn14 mRNA renal expression (RT-PCR) is upregulated in AKI at 72 h and positively correlates with serum BUN levels. Mean \pm s.e.m. of five animals per group. * P < 0.01 versus control. (d) Scatter plot showing the significant negative correlation between kidney mRNA expression for Fn14 and PGC-1 α in AKI at 72 h (n = 10). (e) TWEAK neutralization with specific antibodies prevented PGC-1 α mRNA downregulation in kidneys at 72 h after AKI induction. Mean \pm s.e.m. of 5–6 animals per group. * P < 0.01 versus Control, # P < 0.03 versus AKI with/without immunoglobulin G (IgG) control. (f) Total kidney PGC-1 α protein, measured by western blot, is also reduced in AKI at 72 h, and this reduction is prevented by TWEAK antagonism. Mean \pm s.e.m. of 5–6 animals per group. * P < 0.01 versus control, # P < 0.03 versus AKI. (g) Representative western blot of PGC-1 α expression in lysates from whole kidneys.

TWEAK decreases PGC-1 α expression in cultured renal tubular cells

Next, we studied the effect of TWEAK over cultured renal cells. TWEAK decreased PGC-1 α mRNA expression in a dose- and time-dependent manner (Figure 4a and b). TWEAK also decreased PGC-1 α protein levels in tubular cells (Figure 4c). These results suggest that TWEAK-induced

PGC-1 α downregulation in the kidney is a direct effect of the cytokine over renal tubular cells.

TWEAK negatively affects mitochondrial function through PGC-1 α downregulation in tubular cells

Given the good correlation between the expression of PGC-1 α and its target genes *in vivo*, we explored whether

Table 1 | Relative mRNA expression of PGC-1 α targets in murine AKI versus control kidneys and in murine proximal tubular epithelial cells stimulated with TWEAK versus control

| Gene symbol | Gene description | Mouse kidney (AKI/control ratio) | P-value | Murine proximal tubular cells (TWEAK/control ratio) | P-value |
|-----------------|---|------------------------------------|---------------|---|--------------|
| Ppargc1 β | Peroxisome proliferative-activated receptor- γ coactivator-1 β | 0.595 \pm 0.29 | 0.001 | 1.067 \pm 0.014 | NS |
| Ndufs1 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1 | 0.644 \pm 0.3 | 0.0001 | 0.608 \pm 0.13 | 0.005 |
| Ndubf5 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 β subcomplex, 5 | 0.676 \pm 0.12 | 0.0002 | 1.053 \pm 0.09 | NS |
| Sdha | Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) | 0.751 \pm 0.43 | 0.002 | 0.689 \pm 0.11 | 0.012 |
| Esrra | Estrogen-related receptor- α | 0.764 \pm 0.79 | 0.012 | 1.06 \pm 0.05 | NS |
| Ppara | Peroxisome proliferator-activated receptor- α | 0.769 \pm 0.89 | NS | 0.972 \pm 0.03 | NS |
| Cox5b | Cytochrome c oxidase, subunit Vb | 0.807 \pm 0.61 | 0.014 | 0.985 \pm 0.03 | NS |
| Tfam | Transcription factor A, mitochondrial | 0.808 \pm 0.78 | 0.04 | 0.673 \pm 0.04 | 0.005 |
| Atp5o | ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 | 0.859 \pm 0.7 | 0.048 | 0.997 \pm 0.03 | NS |

Abbreviations: AKI, acute kidney injury; NS, not significant; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α . Bold values indicate P-value AKI vs control or TWEAK vs control.

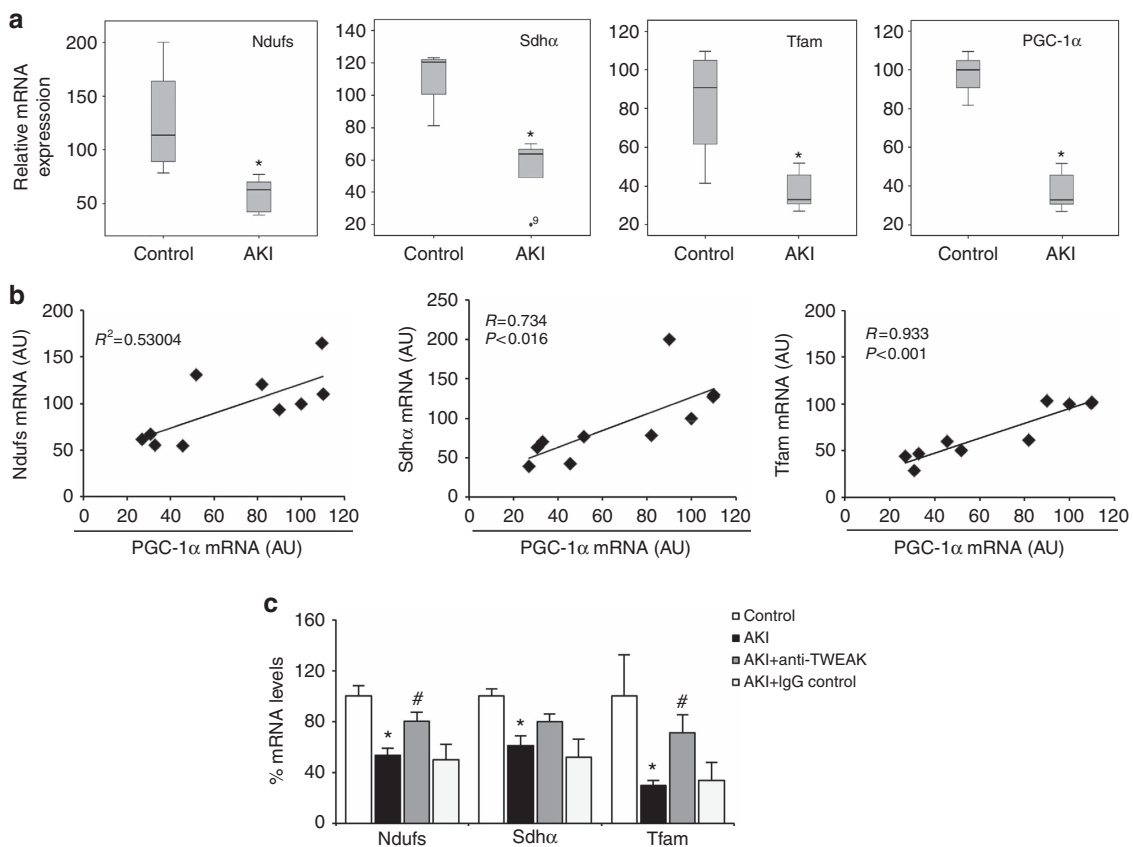


Figure 2 | TWEAK neutralization preserves the expression of PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) target genes during acute kidney injury (AKI). (a) Quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) analyses of kidney PGC-1 α and PGC-1 α -regulated genes *Ndufs1*, *Sdha*, and *Tfam* in mice with AKI at 72 h. Mean \pm s.e.m. of five animals per group. * P < 0.05 versus control. (b) Scatter plot showing the significant positive correlation between kidney mRNA expression for PGC-1 α and *Ndufs1*, *Sdha*, or *Tfam* in mice with AKI at 72 h (n = 10). (c) TWEAK neutralization prevented *Ndufs1*, *Sdha*, and *Tfam* mRNA downregulation in kidneys at 72 h after injury. Mean \pm s.e.m. of 5–6 animals per group. * P < 0.02 versus control, # P < 0.03 versus AKI with/without immunoglobulin G (IgG) control.

TWEAK-induced PGC-1 α downregulation results in reduced expression of genes encoding mitochondrial proteins in cultured tubular cells. In tubular cells, TWEAK decreased the gene expression of *Ndufs1*, *Sdha*, and *Tfam* (Figure 5a). Enforced PGC-1 α overexpression achieved by adenoviral infection (Figure 5b) prevented TWEAK-induced down-

regulation of *Ndufs1*, *Sdha*, and *Tfam* (Figure 5c), suggesting that, indeed, TWEAK downregulation of PGC-1 α led to downregulation of PGC-1 α -dependent genes encoding mitochondrial proteins. Moreover, TWEAK caused loss of mitochondrial membrane potential (MMP) as assessed by decreased tetramethylrhodamine methyl ester staining

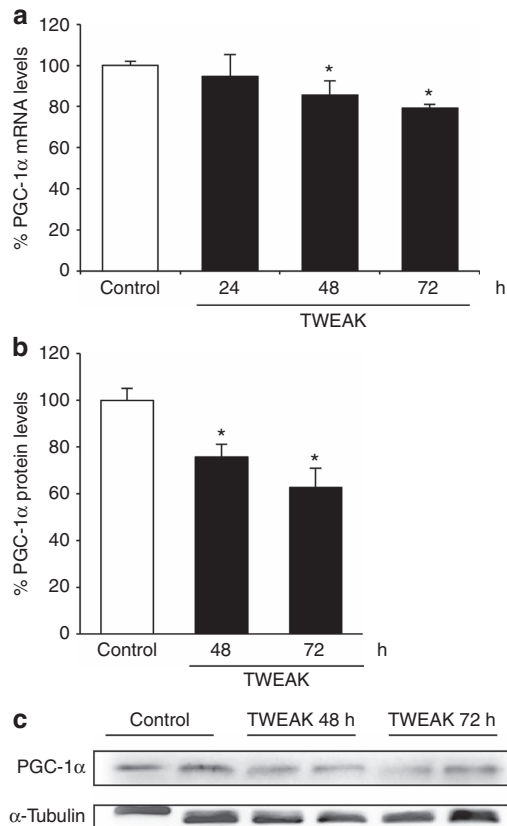


Figure 3 | TWEAK decreases PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) in kidneys from healthy mice. (a) Quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) analyses of renal PGC-1 α mRNA in mice 24, 48, or 72 h after systemic TWEAK administration. Mean \pm s.e.m. of five animals per group. * P < 0.05 versus control. **(b)** Total kidney PGC-1 α protein levels in mice treated with TWEAK for 48 or 72 h measured by western blot. Mean \pm s.e.m. of five animals per group. * P < 0.05 versus control. **(c)** Representative western blot.

(Figure 6a and b). As loss of MMP is also a feature of apoptotic cell death, we measured hypodiploid cells and observed that TWEAK did not induce cell death (Figure 6c). This is in line with prior detailed characterization of TWEAK actions in nonstressed tubular cells describing increased cell proliferation and no effect on cell viability.²³ PGC-1 α overexpression as a result of adenovirus (Ad-PGC-1 α) infection prevented TWEAK-induced MMP loss (Figure 6d). These results indicate that TWEAK may induce mitochondrial injury by downmodulating PGC-1 α levels.

NF- κ B mediates TWEAK-induced PGC-1 α downregulation

Next, we explored the mechanisms that mediate TWEAK-induced PGC-1 α downregulation. In tubular cells TWEAK activates the canonical NF- κ B pathway that mediates multiple effects of TWEAK, such as increased expression of inflammatory cytokines and decreased expression of the anti-aging protein Klotho.^{9,20} We now confirmed TWEAK activation of the canonical NF- κ B pathway by demonstrating nuclear

translocation or RelA (Supplementary Figure S4 online). In this regard, the canonical NF- κ B inhibitor parthenolide²⁴ completely prevented nuclear translocation or RelA and the expression of NF- κ B-dependent genes such as MCP-1 (Supplementary Figures S4 and S5 online)^{9,16} and PGC-1 α downregulation induced by TWEAK at the mRNA and protein levels (Figure 7a and b), suggesting that reduction in PGC-1 α expression by TWEAK is mediated by NF- κ B activation. Moreover, TWEAK induced RelA binding to the PGC-1 α promoter as assessed by chromatin immunoprecipitation (ChIP; Figure 7c).

TWEAK regulates PGC-1 α expression through epigenetic mechanisms

Histone acetylation/deacetylation has a key role in the regulation of gene expression. Indeed, histone deacetylation mediated by histone deacetylase (HDAC) activity is required for p65/RelA-dependent repression of Klotho gene expression induced by TWEAK in kidney tubular cells.²⁰ In this regard, pretreatment of tubular cells with HDAC inhibitors, trichostatin A or valproic acid, prevented PGC-1 α downregulation induced by TWEAK at the mRNA and protein levels (Figure 8a and b). ChIP assays using antibodies against acetylated histones confirmed that TWEAK promotes histone H3 deacetylation at NF- κ B-binding sites at the murine PGC-1 α promoter in renal tubular cells, and this is prevented with trichostatin A pretreatment (Figure 8c).

DISCUSSION

The main findings of this study are that the expression levels of PGC-1 α and PGC-1 α target genes encoding mitochondrial proteins are downregulated in AKI *in vivo*, and this is dependent on the cytokine TWEAK. TWEAK also reduces the expression of PGC-1 α and target genes in cultured tubular cells through NF- κ B activation and histone deacetylation, resulting in impaired mitochondrial function.

PGC-1 α is a transcriptional coactivator expressed in mitochondria-enriched tissues with high energy requirement such as liver, adipose tissue, pancreas, muscle, kidney, and the brain.²⁵ PGC-1 α regulates mitochondrial biogenesis and associates with nuclear respiratory factors and mitochondrial transcription factor A (Tfam) to promote transcription of nuclear genes encoding mitochondrial proteins and mitochondrial biogenesis.^{13,26,27} Studies of PGC-1 α overexpression or loss of function support a role for PGC-1 α in diseases such as heart failure and skeletal muscle atrophy.^{28–30} There is evidence for a protective role of PGC-1 α in kidney disease: (1) kidneys and proximal tubular cells are rich in mitochondria, and mitochondrial changes are a feature of AKI; (2) kidney PGC-1 α levels are reduced in different models of AKI; and (3) PGC-1 α overexpression or activation improves renal function.^{4,6–8,31} Indeed, we observed that PGC-1 α downregulation during AKI correlated with severity of renal failure and was associated with reduced expression of PGC-1 α target genes encoding mitochondrial proteins. Interestingly, expression of the TWEAK receptor Fn14 negatively correlated with

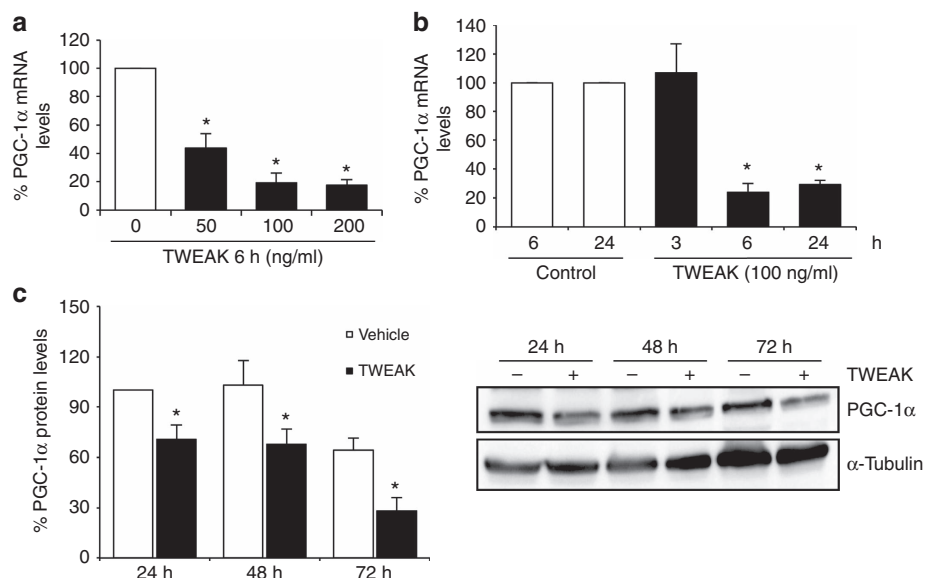


Figure 4 | TWEAK decreases PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) levels in cultured proximal tubular cells. (a) TWEAK decreases PGC-1 α mRNA levels (reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)) in a dose-dependent manner at 6 h in tubular cells. Mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * P < 0.05 versus control. **(b)** Time course of PGC-1 α mRNA levels (RT-PCR) in response to 100 ng/ml TWEAK in tubular cells. Mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * P < 0.05 versus control. **(c)** Time course of total PGC-1 α protein levels in tubular cells incubated with 100 ng/ml TWEAK for different time periods. Western blot. Mean \pm s.e.m. of four independent experiments. * P < 0.05 versus control.

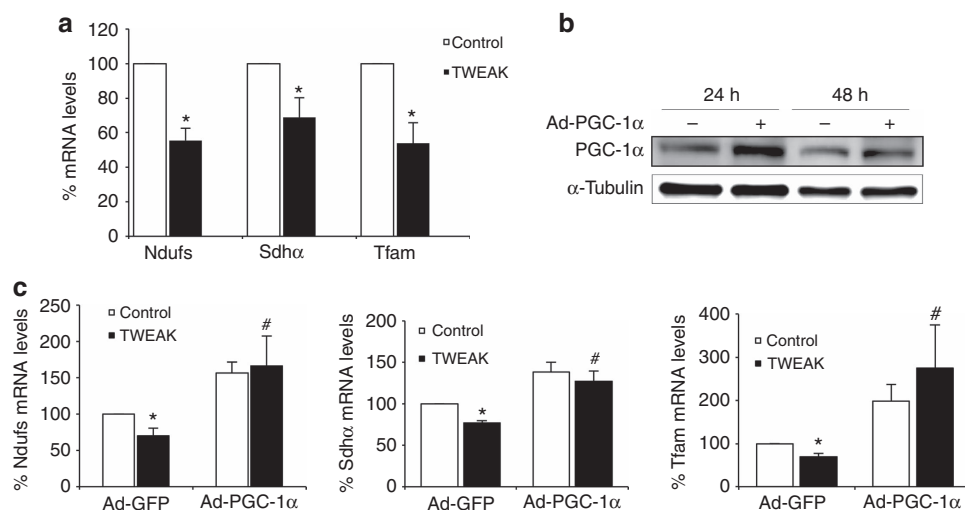


Figure 5 | TWEAK-induced downregulation of PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) results in reduced expression of genes encoding mitochondrial proteins. (a) Expression levels for mitochondrial genes *Ndufs1*, *Sdh α* , and *Tfam* in tubular cells stimulated with 100 ng/ml TWEAK for 48 h (reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)). Mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * P < 0.05 versus control media. **(b)** PGC-1 α expression is upregulated in tubular cells infected with Ad-PGC-1 α compared with Ad-GFP cells. Western blot representative of three independent experiments. **(c)** Ad-PGC-1 α restores the levels of mitochondrial genes reduced by TWEAK. Mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * P < 0.03 versus control media; # P < 0.05 versus TWEAK+Ad-GFP.

PGC-1 α expression, suggesting a relation between PGC-1 α reduced levels and TWEAK/Fn14 activation in AKI. Upregulation of Fn14 expression is the main pathway leading to increased activity of the TWEAK/Fn14 system, and TWEAK/Fn14 targeting protects from diverse features of AKI

(inflammation, cell death, and renal dysfunction) in several experimental models of AKI.^{9,10,14,16,23}

TWEAK mediates PGC-1 α downregulation during AKI, and TWEAK reduced kidney cell PGC-1 α *in vitro* and *in vivo*. These data are consistent with previous reports that TWEAK

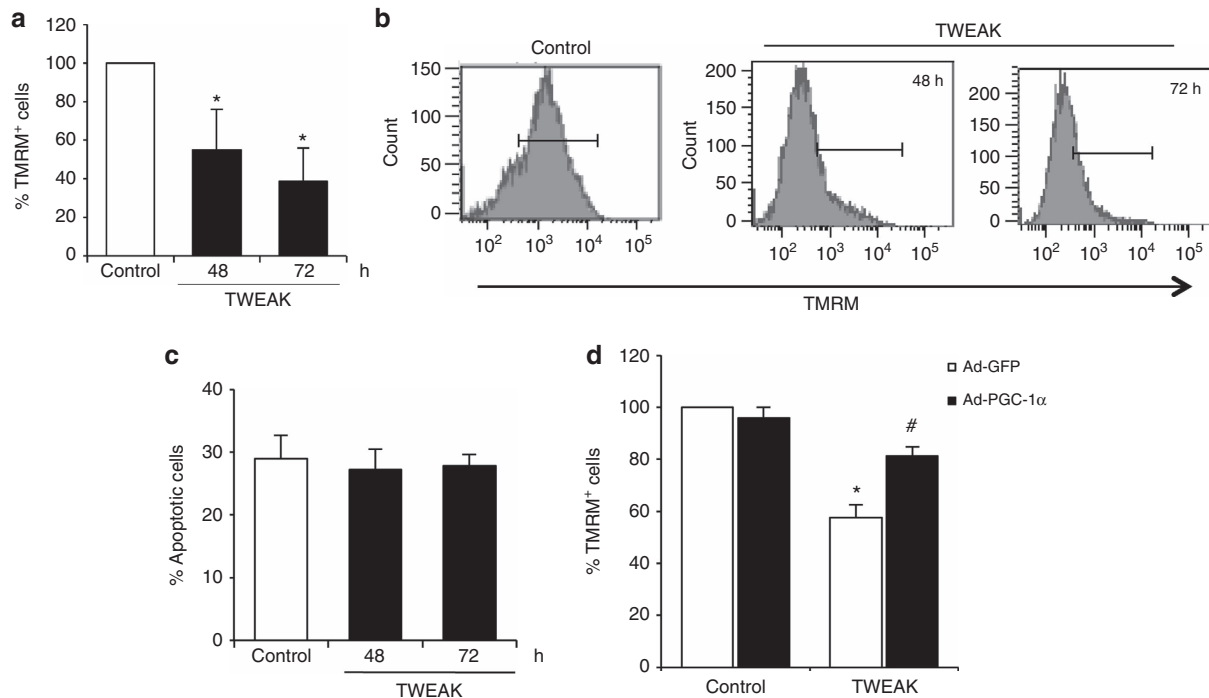


Figure 6 | TWEAK decreases the mitochondrial membrane potential (MMP) in tubular cells. (a) Tubular cells were incubated with 100 ng/ml TWEAK for 48 and 72 h. Cells were stained with tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM), and the MMP was analyzed by flow cytometry. Mean \pm s.e.m. of four independent experiments. * $P < 0.05$ versus control. (b) Representative histogram of TMRM staining in tubular cells treated with TWEAK. Note decreased TMRM staining in cells stimulated with TWEAK. (c) Incubation for 48 and 72 h with 100 ng/ml TWEAK did not promote apoptotic cell death. Cells were permeabilized and stained with propidium iodide to assess hypodiploid cells by flow cytometry. Mean \pm s.e.m. of four independent experiments. (d) PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) overexpression prevents the decrease in MMP (TMRM staining) in tubular cells treated with TWEAK. Mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * $P < 0.003$ versus control, # $P < 0.05$ versus TWEAK-Ad-GFP.

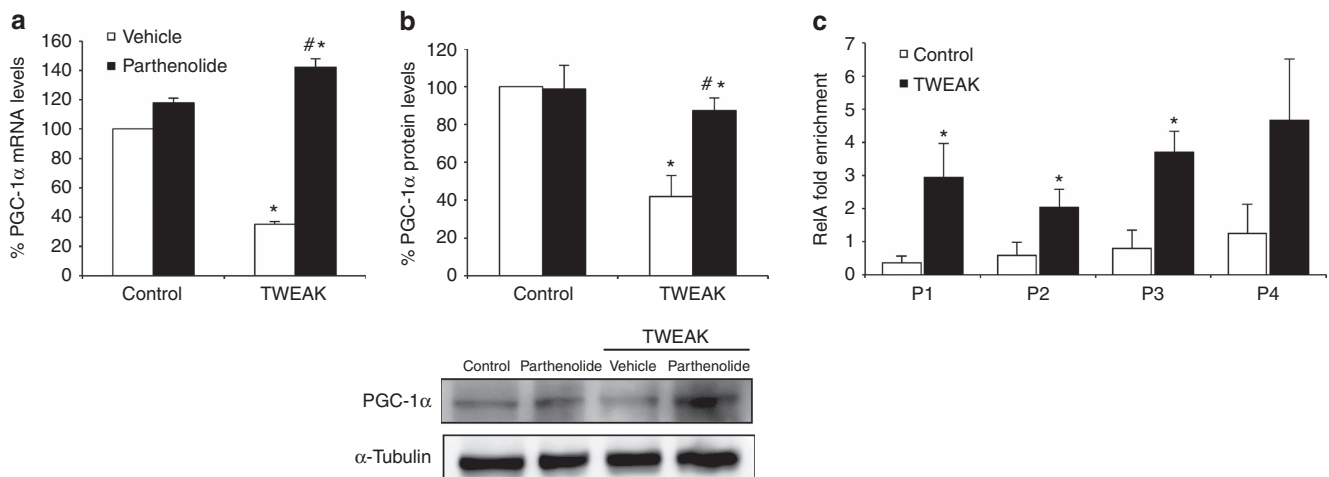


Figure 7 | Nuclear factor (NF)- κ B mediates TWEAK-induced PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) downregulation. (a, b) The NF- κ B inhibitor parthenolide (10 μ M/l) prevents TWEAK-induced PGC-1 α downregulation in cultured tubular cells at 6 h at the (a) mRNA (reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)) and (b) protein (western blot) levels. Mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * $P < 0.05$ versus control, # $P < 0.05$ versus TWEAK alone. (c) Tubular cells were stimulated with TWEAK for 6 h, and chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses were performed using an anti-NF- κ B p65 (RelA) antibody. Promoter copy number was quantified by real-time PCR in duplicate using four specific primers that amplify four different NF- κ B-binding sites of the PGC-1 α promoter. Normal rabbit immunoglobulin G (IgG) was used as negative control for the specificity of the immunoprecipitation (IP). As a positive control, aliquots of chromatin fragments obtained before IP were also subjected to RT-PCR analysis (Input). DNA immunoprecipitated with RelA was normalized to a 100-fold dilution of input chromatin. Data are expressed as fold enrichment of RelA binding compared with negative control antibody (normal rabbit IgG). Mean \pm s.e.m. of three independent experiments.

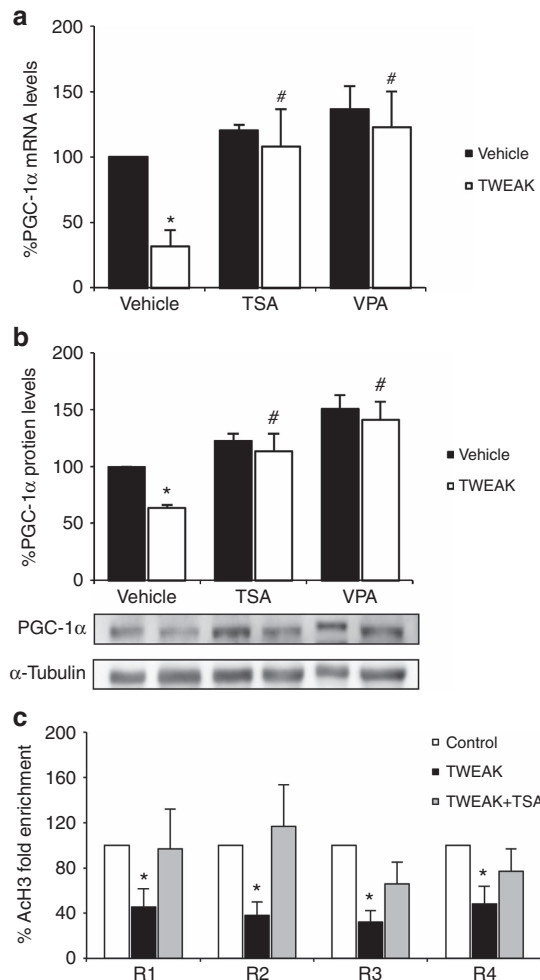


Figure 8 | TWEAK-induced PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) downregulation required histone deacetylase (HDAC) activity. The HDAC inhibitors trichostatin A (TSA) and valproic acid (VPA) prevent downregulation of PGC-1 α expression in tubular cells stimulated with TWEAK at 6 h. Cells were prestimulated with TSA (1.5 ng/ml) or VPA (500 μ M/l) 1 h before addition of TWEAK. (a) PGC-1 α mRNA was assessed by reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). Mean \pm s.e.m. of four independent experiments. * P < 0.05 versus control, # P < 0.05 versus TWEAK alone. (b) Representative western blot and quantification of three independent experiments of PGC-1 α expression in cells treated with HDAC inhibitors and TWEAK. * P < 0.04 versus control; # P < 0.05 versus TWEAK alone. (c) Tubular cells were pretreated with TSA (1.5 ng/ml) for 1 h and stimulated with TWEAK for 6 h, and chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses were performed using an anti-acetylated histone H3 antibody (AcH3). Promoter copy number was quantified by real-time PCR in duplicate using four specific primers that amplify four different nuclear factor (NF)- κ B-binding sites of the PGC-1 α promoter. Normal rabbit immunoglobulin G (IgG) was used as negative control for the specificity of the immunoprecipitation (IP). As a positive control, aliquots of chromatin fragments obtained before IP were also subjected to RT-PCR analysis (Input). DNA immunoprecipitated with AcH3 was normalized to a 100-fold dilution of input chromatin. Data are expressed as fold enrichment of AcH3 binding compared with negative control antibody (normal rabbit IgG). Mean \pm s.e.m. of three independent experiments.

decreased PGC-1 α levels in heart failure and skeletal muscle atrophy disease.^{17,18}

The time course of TWEAK-induced PGC-1 α downregulation is somewhat faster in cultured cells than the decrease in kidney PGC-1 α following TWEAK administration *in vivo*. There are several potential explanations for this discrepancy, including a different latency time from administration of TWEAK to cell exposure to the cytokine, and the more complex *in vivo* environment in terms of multiple cell types, tissue architecture, and others. However, the delayed kidney PGC-1 α response to TWEAK stimulation in healthy mice is consistent with both AKI data and limited experience in other cells and tissues. Thus, in AKI, both early (24 h) PGC-1 α downregulation and renal dysfunction are TWEAK independent and probably a consequence of the initial insult, despite TWEAK and Fn14 upregulation. In contrast, at later time points (72 h), both kidney failure and PGC-1 α downregulation are TWEAK dependent. A similar discrepancy in the time course between cell culture and *in vivo* conditions has been observed in skeletal muscle. TWEAK decreased PGC-1 α mRNA within 24 h in cultured myotubes.¹⁸ However, following *in vivo* denervation, despite the early rise in Fn14 expression, the initial decrease in PGC-1 α mRNA is TWEAK independent, but the subsequent, later (in this case 10 days) decrease in PGC-1 α levels is TWEAK dependent.¹⁸ In this regard, TWEAK induces persistent NF- κ B activation.³²

The physiological relevance of TWEAK-induced PGC-1 α downregulation is supported by the fact that TWEAK also decreased the expression genes encoding mitochondrial proteins and led to loss of MMP. This is consistent with the hypothesis that PGC-1 α downregulation contributes to TWEAK-mediated kidney dysfunction. Furthermore, enforced overexpression of PGC-1 α prevented TWEAK-induced downregulation of PGC-1 α -dependent genes. Among the genes encoding mitochondrial proteins downregulated in AKI *in vivo* and by TWEAK in cultured cells we find Ndufs1, Sdh α , and Tfam, encoding NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1 (NDUFS1), succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) (SDHA), and mitochondrial transcription factor A (TFAM), respectively. NDUFS1 is a component of complex I of the respiratory chain, and Ndufs1 mutations cause neurological disease.^{33,34} SDHA is the main catalytic subunit of mitochondrial complex II and is also a component of a mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channel.³⁵ TFAM is a key mitochondrial transcription factor that regulates mitochondrial DNA replication and repair.³⁶

TWEAK is a member of the TNF superfamily. Neutralizing anti-TNF α antibodies are approved for clinical use in a variety of inflammatory conditions.³⁷ Although TNF actions on kidney cells have been extensively characterized, and they continue to be studied, much less is known about TWEAK actions on kidney cells. Indeed, some basic differences are already known. Thus, TNF promotes death in non-stressed kidney tubular cells,³⁸ whereas TWEAK promotes cell

proliferation.²³ TNF promotes transient canonical NF- κ B pathway activation and chemokine expression, whereas TWEAK promotes both transient canonical and persistent noncanonical NF- κ B pathway activation with secretion of an only partially overlapping set of chemokines.¹⁶ Neutralizing anti-TWEAK antibodies are undergoing clinical trials in lupus nephritis.¹³ Thus, given the potential future availability of TWEAK targeting strategies, is it worth dissecting the different pathways activated by TWEAK in the setting of kidney injury. TWEAK decreased MMP without inducing cell death. However, TWEAK is known to sensitize to cell death in conjunction with other stimuli, such as proinflammatory milieu³⁹ or uremic toxins.⁴⁰ The decreased PGC-1 α and mitochondrial dysfunction induced by TWEAK may contribute to sensitization to the lethality of other stimuli.

TWEAK and NF- κ B pathway are well-known activators of the inflammatory response. In addition, the present results suggest that they may further promote kidney injury in cooperation with histone deacetylation by decreasing the expression of factors with a cell protective function, including PGC-1 α and, as previously described, Klotho,²⁰ that prevents stress-induced senescence and has anti-inflammatory and antifibrotic functions.¹⁹ Histone deacetylation had a key role in downregulating PGC-1 α expression. This effect appeared to be dependent on histone deacetylation at NF- κ B-binding sites at the PPARGC1A locus promoter as RelA bound to the same sites. We relied on inhibitors to interfere with TWEAK actions, and inhibitors may have nonspecific effects. However, two different HDAC inhibitors yielded similar results, and promotion of histone acetylation by trichostatin A was confirmed. Furthermore, parthenolide inhibition of NF- κ B has been characterized in detail in this cell system.^{9,21} In this regard, the clinical translation of these observations will likely come in the form of inhibitors. Thus, HDAC inhibitors are undergoing clinical trials and potentially have multiple gene targets. An improved understanding of the range of targets may help further refine this therapeutic approach.

Figure 9 summarizes our current hypothetical mechanism for TWEAK-induced PGC-1 α downregulation. On the basis of the current results and the evolving understanding of the NF- κ B system, we hypothesize that NF- κ B RelA binding to the PGC-1 α promoter may recruit HDAC corepressor proteins that promote histone deacetylation and chromatin condensation, thus repressing gene expression. The transactivation function of NF- κ B has long been known to be regulated in part through the association of NF- κ B RelA with HDAC corepressor proteins.⁴¹ This was initially described as a mechanism that limited the upregulation of the expression of NF- κ B-regulated genes and controlled the induced level of expression of these genes.⁴¹ However, in recent years, several examples have been described of NF- κ B-mediated gene suppression through NF- κ B RelA recruitment of HDAC and subsequent decreased histone acetylation and repressed gene expression.^{42–44} These include oxygen radical-induced downregulation of TRPC6 expression in mesangial cells,⁴² platelet-derived growth factor-D repression by interleukin-1 β

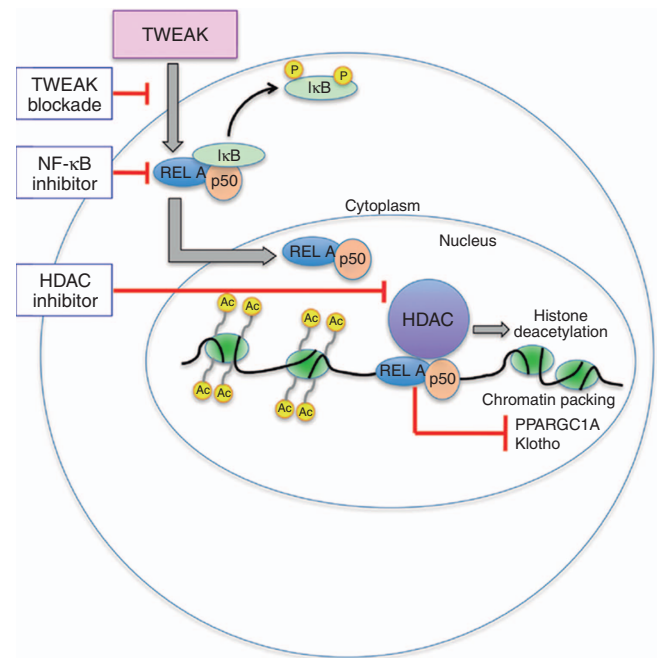


Figure 9 | Hypothetical model for TWEAK-induced, nuclear factor (NF)- κ B-mediated downregulation of PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) expression: recruitment of histone deacetylase (HDAC). Data presented here are consistent with the hypothesis that upon TWEAK stimulation, NF- κ B RelA directly binds to the promoter of the *PPARGC1A* gene encoding PGC-1 α to recruit, as described for other cell systems,⁴¹ HDAC corepressor proteins, thus leading to histone deacetylation and chromatin packing that contributes to suppress gene expression. This mechanism may also lead to Klotho downregulation.²⁰

in smooth muscle cells,⁴³ and TNF- α -induced suppression of YKL-40 expression in glioma cells.⁴⁴

In summary, the current work suggests that TWEAK/Fn14 signaling represses PGC-1 α expression during AKI through activation of canonical NF- κ B pathways and epigenetic mechanisms including histone deacetylation on NF- κ B-binding sites. These results may be relevant to design therapeutic approaches to upregulate PGC-1 α expression during kidney injury.

MATERIALS AND METHODS

Animal models

All procedures were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory and were approved by the animal ethics committee of IIS-FJD (Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz). C57/BL/6 female mice (12 weeks old; Charles River, Chatillon-sur-Charlaronne, France) were treated intraperitoneally with 25 μ g/kg TWEAK (Alexis, Enzo Life Sciences, Laüfelfingen, Switzerland) or its vehicle (saline), and mice were killed 24, 48, or 72 h later ($n = 5$ per group). The dose of TWEAK was calculated based on *in vitro* experiments for an extracellular volume of 6.5 ml per mouse and was previously shown to induce biological responses in kidneys.⁹

Folic acid nephropathy is a classical model of kidney tubulointerstitial injury and inflammation.⁹ C57BL/6 mice (12–14 weeks old) received a single intraperitoneal injection of folic

acid (Sigma, St Louis, MO) 300 mg/kg in 0.3 mol/l sodium bicarbonate or vehicle, and mice were killed 6, 24, and 72 h, or 7 days later ($n=5$). In a second experiment, mice were dosed intraperitoneally with 200 μ g neutralizing anti-TWEAK monoclonal antibody (clone P2D10, Biogen Idec, Cambridge, MA) or isotype control immunoglobulin G (IgG)^{20,21} ($n=5-6$ per group). Animals received the monoclonal antibody 1 day before and 2 days after folic acid injection, and they were killed 24 and 72 h after folic acid injection. Kidneys were perfused *in situ* with cold saline before removal. One kidney was snap frozen in liquid nitrogen for RNA and protein studies and the other fixed and paraffin embedded.

Transcriptomics arrays

Transcriptomics arrays of kidney tissue ($n=3$ kidneys obtained 24 h after folic acid and $n=3$ obtained 24 h after vehicle acid administration to mice) and MCT tubular cells exposed to 100 ng/ml TWEAK for 6 h or vehicle ($n=3$ independent experiments) were performed at Unidad Genómica Moncloa, Fundación Parque Científico de Madrid, Madrid, Spain. Affymetrix (Santa Clara, CA) microarray analysis followed the manufacturer's protocol.^{20,21} Image files were initially obtained through Affymetrix GeneChip Command Console Software (AGCC). Subsequently, Robust Multichip Analysis was performed using Affymetrix Expression Console Software. Starting from the normalized Robust Multichip Analysis, the Significance Analysis of Microarrays was performed using the limma package (Babelomics, www.babelomics.org), using a false discovery rate of 5% to identify genes that were significantly differentially regulated between the analyzed groups.

Cells and reagents

MCT murine proximal tubular epithelial cells are a cell line originally harvested from the cortex of SJL mice and extensively characterized.^{45,46} Cells were cultured in RPMI-1640 with 10% fetal bovine serum, 2 mmol/l glutamine, and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin) in 5% CO₂ at 37 °C. RPMI-1640, penicillin, streptomycin, and trypsin-EDTA were from BioWhittaker (Waltham, MA) and fetal bovine serum from Gibco (Carlsbad, CA). For experiments, cells were serum depleted for 24 h and then stimulated with different molecules. Recombinant human TWEAK (Millipore, Billerica, MA), unless otherwise specified, was used at 100 ng/ml, based on prior dose-response studies performed in our lab.^{9,23} The HDAC inhibitors trichostatin A (Upstate Biotechnology, Millipore) and valproic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) were used at 1.5 ng/ml and 500 μ mol/l, respectively. The NF- κ B inhibitor parthenolide (Sigma) was used at 10 μ mol/l based on previous dose-response studies in this system.⁹ For adenovirus experiments, MCT cells were infected with a green fluorescent protein control virus or an adenovirus encoding murine PGC-1 at 48 h before the experiment. Efficiency was confirmed by green fluorescent protein visualization and PGC-1 α expression by western blot.

RNA extraction and real-time PCR

Total RNA was extracted from cells by the TRI Reagent method (Invitrogen, Paisley, UK), and 1 μ g RNA was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). All assays were from Applied Biosystems. Quantitative PCR was performed by 7500 Real-Time PCR System with the Prism 7000 System SDS Software (Applied Biosystems), and RNA expression of different genes was corrected for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).⁹

Western blot

Cell samples were homogenized in lysis buffer (50 mmol/l Tris HCl, 150 mmol/l NaCl, 2 mmol/l EDTA, 2 mmol/l EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40, 0.1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 μ g/ml pepstatin A) and then separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions. After electrophoresis, samples were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore), blocked with 5% skimmed milk in phosphate-buffered saline (PBS)/0.5% v/v Tween-20 for 1 h, washed with PBS/Tween, and incubated with mouse polyclonal anti-PGC-1 α (1:1000, CalBiochem, La Jolla, CA) diluted in 5% milk PBS/Tween, anti-Fn14 (1:1000, Cell Signalling, Danvers, MA), or anti-TWEAK (1:1000, Novus Laboratories, Bristol, VA) diluted in 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS/Tween. Blots were washed with PBS/Tween and incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2000, Amersham, Aylesbury, UK). After washing with PBS/Tween, blots were developed with the chemiluminescence method (ECL) (Amersham) and probed with mouse monoclonal anti- α -tubulin antibody (1:2000, Sigma). Levels of expression were corrected for minor differences in loading.

Immunofluorescence

Kidney tissue immunofluorescence was performed in 3 μ m thick sections of paraffin-embedded tissue using a PT-link device (with a low pH solution for TWEAK and a high pH solution for Fn14, 95 °C, 20 min). Sections were then washed with PBS for 5 min and blocked by incubation with 4% PBS/BSA+6% serum. For immunostaining, sections were incubated with anti-Fn14 (1:50 in 4% PBS/BSA+1% serum, Cell Signalling) or anti-TWEAK (1:10 in 4% PBS/BSA+2% serum, R&D, Minneapolis, MN) at 4 °C overnight, followed by incubation with Alexa Fluor 633-goat anti-rabbit IgG for Fn14 and Alexa Fluor 633-rabbit anti-goat for TWEAK (1/200 in 4% BSA/PBS, Invitrogen) for 1 h at 37 °C. Then, tissues were incubated with fluorescein-conjugated Lotus tetragonolobus lectin (Vector Labs, Burlingame, CA) for proximal tubules staining or Dolichos biflorus lectin (Sigma) for distal tubules staining (1/30 in 4% BSA/PBS) for 30 min at room temperature, counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole, and mounted. Negative controls included incubation with isotype IgG.

Mitochondrial membrane potential

Changes in MMP were determined as differences in tetramethylrhodamine methyl ester fluorescence (Molecular Probes, Life Technologies, Foster City, CA). Adherent cells were pooled with spontaneously detached cells and stained with 150 nmol/l tetramethylrhodamine methyl ester for 10 min at 37 °C. Fluorescence intensity was measured by flow cytometry using BD FACS Diva Software (BD Biosciences, San Jose, CA). Decreased tetramethylrhodamine methyl ester fluorescence indicates that MMP is reduced.

Characterization of apoptotic cells

For assessment of apoptosis by flow cytometry, adherent cells were pooled with spontaneously detached cells and incubated in 100 μ g/ml propidium iodide, 0.05% NP-40, and 10 μ g/ml RNase A in PBS at 4 °C for > 1 h. This assay permeabilizes the cells, and thus propidium iodide stains both live and dead cells. The percentage of apoptotic cells with decreased DNA staining (hypodiploid cells) was counted flow cytometry using BD FACS Diva Software (BD Biosciences).

ChIP assay

To perform ChIP assays, we used 0.5 to 1×10^6 cells per sample as described previously.²⁰ In brief, cells fixed with 35% formaldehyde were lysed in Lysis Buffer (5 mmol/l HEPES, 85 mmol/l KCl, 0.5% NP-40, pH 8.0, plus protease inhibitor cocktail), and the pellet was resuspended in Nuclei Lysis Buffer (50 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l EDTA, and 1% sodium dodecyl sulfate, pH 8.1) and sonicated in a Diagenode sonicator (Denville, NJ). For ChIP, anti-rabbit IgG Dynabeads (Life Technologies, Foster City, CA) were used. Chromatin was diluted into ChIP Binding Buffer (10% Triton-X, 10% sodium deoxycholate, TE plus protease inhibitor cocktail) and immunoprecipitated using IgG Dynabeads with 3 μ g anti-acetyl-Histone H3 (Lys9) (Merck Millipore, Billerica, MA) antibody or anti-NF- κ B p65 (RelA) (Merck Millipore) antibody. Antibody-chromatin complexes were then washed and eluted from beads using Elution Buffer (1 mol/l Tris (pH 8.0), 0.5 mol/l EDTA, 10% sodium dodecyl sulfate, and dH₂O). After crosslink reversal and proteinase K treatment, DNA was extracted with phenol/chloroform, and ethanol was precipitated. DNA immunoprecipitated from 1 μ l eluted DNA was analyzed in duplicate by real-time PCR. Primers were designed to amplify NF- κ B (regions 1 and 4) at the promoter of the PGC-1 α gene, identified by ALGGEN-PROMO (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3). Aliquots of chromatin obtained before immunoprecipitation were analyzed as input control. Primers for each region are listed in Supplementary Table S1 online. Results are presented as fold enrichment of precipitated DNA associated with a given histone modification binding, relative to a 1:100 dilution of input chromatin.

Statistics

Statistical analysis was performed using the SPSS 11.0 statistical software (Chicago, IL). Results are expressed as mean \pm s.e.m. Significance at the $P < 0.05$ level was assessed by nonparametric Mann-Whitney U -test for two groups and analysis of variance (Fisher's least significant difference *post hoc* test) for three or more groups. Pearson's correlation was used to assess correlation between two continuous variables.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by ISCIII and FEDER funds PI13/00047, PIE13/00051, EUTOX, CP12/03262, CP14-00133, FRIAT Sociedad Española de Nefrología, ISCIII-RETIC REDinREN RD012/0021, and Comunidad de Madrid CIFRA S2010/BMD-2378. The salary support was as follows: F.P.U. to OR-A, ISCIII Miguel Servet MS12/03262 to ABS and MS14/00133 MDS-N, and Programa Intensificación Actividad Investigadora (ISCIII/Agencia Laín-Entralgo/CM) to AO. We thank Linda Burkly for critically reading the manuscript and for helpful suggestions.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Renal function parameters in folic acid-induced AKI.

Figure S2. Increased kidney TWEAK and Fn14 expression in folic acid-induced AKI.

Figure S3. Effect of TWEAK neutralization on early kidney dysfunction.

Figure S4. Parthenolide inhibits TWEAK-induced NF κ B activation.

Figure S5. NF κ B mediates TWEAK-induced PGC-1 α downregulation.

Table S1. Primers for ChIP (chromatin immunoprecipitation) real-time RT-PCR.

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/ki>

REFERENCES

- Zhu C, Xuan X, Che R *et al.* Dysfunction of the PGC-1 α -mitochondria axis confers adriamycin-induced podocyte injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; **306**: F1410–F1417.
- Siew ED, Davenport A. The growth of acute kidney injury: a rising tide or just closer attention to detail? *Kidney Int* 2015; **87**: 46–61.
- Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet* 2012; **380**: 756–766.
- Tábara LC, Poveda J, Martin-Cleary C *et al.* Mitochondria-targeted therapies for acute kidney injury. *Expert Rev Mol Med* 2014; **16**: e13.
- Rato L, Duarte AI, Tomás GD *et al.* Pre-diabetes alters testicular PGC1- α /SIRT3 axis modulating mitochondrial bioenergetics and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1837**: 335–344.
- Stallons LJ, Whitaker RM, Schnellmann RG. Suppressed mitochondrial biogenesis in folic acid-induced acute kidney injury and early fibrosis. *Toxicol Lett* 2014; **224**: 326–332.
- Funk JA, Schnellmann RG. Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; **302**: F853–F864.
- Tran M, Tam D, Bardia A *et al.* PGC-1 α promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. *J Clin Invest* 2011; **121**: 4003–4014.
- Sanz AB, Justo P, Sanchez-Niño MD *et al.* The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 695–703.
- Hotta K, Sho M, Yamato I *et al.* Direct targeting of fibroblast growth factor-inducible 14 protein protects against renal ischemia reperfusion injury. *Kidney Int* 2011; **79**: 179–188.
- Xia Y, Herlitz LC, Gindea S *et al.* Deficiency of fibroblast growth factor-inducible 14 (fn14) preserves the filtration barrier and ameliorates lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**: 1053–1070.
- Sanz AB, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD *et al.* TWEAK and the progression of renal disease: clinical translation. *Nephrol Dial Transplant* 2014; **29**(Suppl 1): i54–i62.
- Medvedeva NV, Prossorovskiy VN, Ignatov DV *et al.* Pharmacological agents and transport nanosystems based on plant phospholipids. *Biomed Khim* 2015; **61**: 219–230.
- Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM *et al.* NF- κ B in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 1254–1262.
- Poveda J, Tábara LC, Fernandez-Fernandez B *et al.* TWEAK/Fn14 and non-canonical NF- κ B signaling in kidney disease. *Front Immunol* 2013; **4**: 447.
- Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC *et al.* TWEAK activates the non-canonical NF κ B pathway in murine renal tubular cells: modulation of CCL21. *PLoS One* 2010; **5**: e8955.
- Shi J, Jiang B, Qiu Y *et al.* PGC1 α plays a critical role in TWEAK-induced cardiac dysfunction. *PLoS One* 2013; **8**: e54054.
- Hindi SM, Mishra V, Bhatnagar S *et al.* Regulatory circuitry of TWEAK-Fn14 system and PGC-1 α in skeletal muscle atrophy program. *FASEB J* 2014; **28**: 1398–1411.
- Zhou L, Li Y, Zhou D *et al.* Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/ β -catenin signaling. *J Am Soc Nephrol* 2013; **24**: 771–785.
- Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD *et al.* The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal klotho expression through NF κ B. *J Am Soc Nephrol* 2011; **22**: 1315–1325.
- Izquierdo MC, Sanz AB, Mezzano S *et al.* TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int* 2012; **81**: 1098–1107.
- Jarr KU, Eschricht S, Burkly LC *et al.* TNF-like weak inducer of apoptosis aggravates left ventricular dysfunction after myocardial infarction in mice. *Mediators Inflamm* 2014; **2014**: 131950.
- Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC *et al.* Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: a role in uninephrectomy induced renal hyperplasia. *J Cell Mol Med* 2009; **13**: 3329–3342.
- Hegner SP, Hofmann TG, Dröge W *et al.* The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF- κ B by targeting the I κ B kinase complex. *J Immunol* 1999; **163**: 5617–5623.
- Besseiche A, Riveline JP, Gautier JF *et al.* Metabolic roles of PGC-1 α and its implications for type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2015. (doi:10.1016/j.diabet.2015.02.002; e-pub ahead of print)
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999; **98**: 115–124.

27. Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 2006; **116**: 615–622.
28. Vainshtein A, Desjardins EM, Armani A *et al*. PGC-1 α modulates denervation-induced mitophagy in skeletal muscle. *Skelet Muscle* 2015; **5**: 9.
29. Arany Z, He H, Lin J *et al*. Transcriptional coactivator PGC-1 α controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 2005; **1**: 259–271.
30. Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ *et al*. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res* 2004; **94**: 525–533.
31. Funk JA, Schnellmann RG. Accelerated recovery of renal mitochondrial and tubule homeostasis with SIRT1/PGC-1 α activation following ischemia-reperfusion injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; **273**: 345–354.
32. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ortiz A. TWEAK, a multifunctional cytokine in kidney injury. *Kidney Int* 2011; **80**: 708–718.
33. Dieteren CE, Koopman WJ, Swarts HG *et al*. Subunit-specific incorporation efficiency and kinetics in mitochondrial complex I homeostasis. *J Biol Chem* 2012; **287**: 41851–41860.
34. Petruzzella V, Sardanelli AM, Scacco S *et al*. Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in neurological disorders: genetics and pathogenetic mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 2012; **942**: 371–384.
35. Hoekstra AS, Bayley JP. The role of complex II in disease. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1827**: 543–551.
36. Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JM *et al*. The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 3225–3236.
37. Kalunian K, Merrill JT. New directions in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Curr Med Res Opin* 2009; **25**: 1501–1514.
38. Ortiz A, Lorz C, Catalán MP *et al*. Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int* 2000; **57**: 969–981.
39. Justo P, Sanz AB, Sanchez-Niño MD *et al*. Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK. *Kidney Int* 2006; **70**: 1750–1758.
40. Poveda J, Sanchez-Niño MD, Glorieux G *et al*. p-cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2014; **29**: 56–64.
41. Ashburner BP, Westerheide SD, Baldwin AS. The p65 (RelA) subunit of NF- κ B interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 7065–7077.
42. Wang Y, Ding M, Chaudhari S *et al*. Nuclear factor κ B mediates suppression of canonical transient receptor potential 6 expression by reactive oxygen species and protein kinase C in kidney cells. *J Biol Chem* 2013; **288**: 12852–12865.
43. Liu MY, Khachigian LM. Histone deacetylase-1 is enriched at the platelet-derived growth factor-D promoter in response to interleukin-1 β and forms a cytokine-inducible gene-silencing complex with NF- κ B p65 and interferon regulatory factor-1. *J Biol Chem* 2009; **284**: 35101–35112.
44. Bhat KP, Pelloski CE, Zhang Y *et al*. Selective repression of YKL-40 by NF- κ B in glioma cell lines involves recruitment of histone deacetylase-1 and -2. *FEBS Lett* 2008; **582**: 3193–3200.
45. Haverly TP, Kelly CJ, Hines WH *et al*. Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1359–1368.
46. Strutz F, Okada H, Lo CW *et al*. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 1995; **130**: 393–405.